



2013

**Sofia Farias Soares**

**Epidemiologia de estirpes produtoras de  
ESBL em ITU**



**Sofia Farias Soares**

## **Epidemiologia de estirpes produtoras de ESBL em ITU**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica especialização em Bioquímica Clínica, realizada sob a orientação científica do Professor Dr. Elmano José da Cruz Ramalheira, professor auxiliar convidado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e Diretor do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospital do Baixo Vouga, EPE – Hospital Infante D. Pedro, Aveiro, e Doutora Sónia Cristina das Neves Ferreira, Diretora do Departamento de Saúde, Ciência e Educação do Instituto da Educação e Cidadania, Mamarrosa.

## **o júri**

Presidente

**Prof. Doutora Rita Maria Pinto Ferreira**

Professora auxiliar convidada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Doutor Nuno Ricardo Furtado Dias Mendonça**

Investigador do Centro de estudos farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

**Prof. Dr. Elmano José da Cruz Ramalheira**

Professor auxiliar convidado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e Diretor do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospital do Baixo Vouga, EPE – Hospital Infante D. Pedro, Aveiro

**Doutora Sónia Cristina das Neves Ferreira**

Diretora do Departamento de Saúde, Ciência e Educação do Instituto da Educação e Cidadania, Mamarrosa

## **agradecimentos**

Este trabalho representa a finalização de uma etapa ao longo da qual adquiri competências pessoais e profissionais com todos aqueles que se cruzaram comigo ao longo desta etapa, por todos os ensinamentos, ajuda e compreensão tenho alguns agradecimentos a fazer.

Ao Professor Dr. Elmano Ramalheira, orientador deste trabalho, quero agradecer por me ter recebido no laboratório de microbiologia do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, pelos conhecimentos transmitidos, orientação científica, incentivo e confiança.

À Doutora Sónia Ferreira, co-orientadora, tenho a agradecer a incansável orientação científica e laboratorial, o modo empenhado e estimulante com que acompanhou todas as fases deste trabalho, a constante disponibilidade, sugestões e críticas que permitiram enriquecer a minha formação académica.

À Catarina Brandão, que esteve sempre comigo no laboratório, agradeço a ajuda e o companheirismo.

Aos meus pais, sem os quais nunca teria chegado onde cheguei, que sempre acreditaram no meu empenho, agradeço pelo apoio incondicional.

*A todos muito Obrigada.*

## palavras-chave

$\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL), *Enterobacteriaceae*, antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, infecções do trato urinário, resistência a antibióticos.

## resumo

A produção de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) é o mecanismo de resistência mais importante aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em bactérias da família *Enterobacteriaceae*. A disseminação destas espécies produtoras de ESBL na comunidade é uma realidade descrita a nível mundial, principalmente na Europa. A deteção destas estirpes é extremamente relevante em termos de qualidade de informação para o clínico, (pelas implicações terapêuticas imediatas), mas também pela importância em termos epidemiológicos dos microrganismos produtores destas enzimas, o que deve contribuir para diminuir a sua disseminação na comunidade e no ambiente hospitalar.

Neste contexto, são necessários estudos que permitam conhecer o panorama mais realista da distribuição destes microrganismos, quer no meio ambiente, quer no meio hospitalar, de forma a fornecer melhores cuidados de saúde. Assim, é fundamental que o diagnóstico *in vitro* seja efetuado com recurso a metodologias de alta especificidade e sensibilidade, adequadas à realidade hospitalar.

Os principais objetivos deste estudo foram averiguar quais os principais agentes causadores de infecções do trato urinário, na população servida pelo Centro Hospitalar do Baixo Vouga e inferir sobre a disseminação de ESBL nos isolados causadores destas infecções.

Das 424 amostras estudadas, 88% foram bactérias Gram-negativas. A bactéria Gram-negativa mais prevalente foi a espécie *Escherichia coli* (54,7%) seguida da *Klebsiella pneumoniae* (22,5%). Os isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* foram testados para detetar a presença de ESBL, dos quais 28,8% (83/288) foram classificados como produtores de ESBL.

Este estudo permite dispor dados importantes sobre a epidemiologia de estirpes produtoras de ESBL na região geográfica em questão, e disponibilizar informação sobre os seus padrões de resistências necessários para se iniciar uma terapêutica antimicrobiana adequada e elaborar protocolos de tratamento.

## keywords

Extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL), *Enterobacteriaceae*,  $\beta$ -lactam antibiotics, urinary tract infections, antibiotic resistance.

## abstract

The production of extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) is the most important mechanism of resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in bacteria of the family *Enterobacteriaceae*. The dissemination of these ESBL-producing species in the community is a reality described worldwide, mostly in Europe. The detection of these strains is highly relevant for the clinician, since it will have direct implications in the following therapeutic. Also, the importance of epidemiological studies of bacteria producing these enzymes are critical, once they should contribute to reduce the community and hospital spread.

In this context, studies are needed to allow us to know the scene more realistic distribution of these organisms on the environment among hospitals units and to provide better health care. Therefore, it is essential that *in vitro* diagnostics will be performed using the methods with high specificity and sensitivity, appropriate to the hospital needs.

The main objectives of this study were to investigate the most prevalent pathogen in urinary tract infections of the Centro Hospitalar do Baixo Vouga patients, and infer about the dissemination of ESBL in isolates causing these infections.

Of the 424 samples analyzed, 88% were Gram-negative bacteria. *Escherichia coli* was the most prevalent Gram-negative bacteria (54,7%) followed by *Klebsiella pneumoniae* (22,5%). The strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* were tested to detect the presence of ESBL, and 28.8% (83/288) were classified as ESBL producers.

This study allows us to provide important data on the epidemiology of ESBL-producing strains in the geographical region studied. Also, it provides information on their pattern of resistance, which is critical for the success of antimicrobial therapy and the development of adapted treatment protocols.

# ÍNDICE

---

Abreviaturas	i
<b>I. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>5</b>
2.1. Infecções do Trato Urinário	7
2.2. <i>Enterobacteriaceae</i>	10
2.3. Antibióticos	12
2.3.1. Definição e classificação dos antibióticos $\beta$ -lactâmicos	12
2.3.2. Mecanismo de ação dos antibióticos $\beta$ -lactâmicos	13
2.4. Origem da resistência aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos	14
2.5. Mecanismos de resistência bacteriana aos $\beta$ -lactâmicos	15
2.6. $\beta$ -lactamases	17
2.6.1. Definição e classificação das $\beta$ -lactamases	18
2.7. $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL)	21
2.7.1. Principais tipos de ESBL (TEM, SHV, CTX-M e OXA)	23
2.7.2. Comportamento das ESBL e importância da sua detecção laboratorial	26
2.7.3. Métodos de detecção de estirpes produtoras de ESBL	27
2.7.3.1. Detecção fenotípica	27
2.7.3.2. Detecção genotípica	29
2.8. Epidemiologia das <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de ESBL	30
<b>III. OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
<b>IV. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>37</b>
4.1. Caracterização do Hospital Infante D.Pedro, EPE	39
4.2. Amostra	40
4.2.1. Identificação das espécies bacterianas	40
4.2.2. Avaliação da susceptibilidade aos antibióticos	42
4.2.3. Teste VITEK <sup>®</sup> 2 ESBL	43
4.2.4. Método quantitativo E-test	44
4.3. Tratamento estatístico	45

<b>V. RESULTADOS</b>	<b>47</b>
<b>5.1. Caracterização da população em estudo</b>	<b>49</b>
<b>5.2. Caracterização dos isolados clínicos</b>	<b>51</b>
<b>5.3. Perfis de resistência aos antibióticos</b>	<b>54</b>
<b>VI. DISCUSSÃO</b>	<b>61</b>
<b>VII. CONCLUSÃO</b>	<b>73</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>77</b>
<b>IX. ANEXOS</b>	<b>87</b>



## **Lista de publicações originais**

---

Esta dissertação inclui resultados da seguinte publicação:

**S. Soares\***, C. Brandão, S. Ferreira, E. Ramalheira. (2013) Surveillance of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producers causing urinary tract infections in Aveiro, Portugal. (Publicação *online* no *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*: [http://registration.akm.ch/einsicht.php?XNABSTRACT\\_ID=165326&XNSPRACHE\\_ID=2&XNKONGRESS\\_ID=180&XNMASKEN\\_ID=900#](http://registration.akm.ch/einsicht.php?XNABSTRACT_ID=165326&XNSPRACHE_ID=2&XNKONGRESS_ID=180&XNMASKEN_ID=900#)) – ANEXO I

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura 1</b> – Estruturas moleculares da família dos antibióticos $\beta$ -lactâmicos_____	<b>13</b>
<b>Figura 2</b> – Representação esquemática dos mecanismos de resistência aos $\beta$ -lactâmicos em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas_____	<b>17</b>
<b>Figura 3</b> – Diferentes etapas do método automático VITEK <sup>®</sup> 2_____	<b>42</b>
<b>Figura 4</b> – Tiras E-test <sup>®</sup> ESBL – CT/CTL e TZ/TZL_____	<b>44</b>
<b>Figura 5</b> – Distribuição geral dos pacientes estudados por faixa etária_____	<b>49</b>
<b>Figura 6</b> – Distribuição dos pacientes estudados por género e faixa etária_____	<b>50</b>
<b>Figura 7</b> – Incidência dos isolados clínicos em termos globais_____	<b>51</b>
<b>Figura 8</b> – Prevalência das principais bactérias Gram-negativas_____	<b>51</b>
<b>Figura 9</b> – Incidência dos isolados produtores de ESBL_____	<b>52</b>
<b>Figura 10</b> – Número de microrganismos produtores de ESBL por género e faixa etária_	<b>54</b>
<b>Figura 11</b> – Perfil de resistência dos microrganismos Gram-negativos às diferentes classes de antibióticos testados_____	<b>55</b>
<b>Figura 12</b> – Perfil de resistência dos isolados de <i>Escherichia coli</i> em relação aos antibióticos testados_____	<b>56</b>
<b>Figura 13</b> – Perfil de resistência dos isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> em relação aos antibióticos testados_____	<b>57</b>
<b>Figura 14</b> – Perfil de resistência dos isolados produtores de ESBL_____	<b>58</b>
<b>Figura 15</b> – Perfil de resistência dos isolados de <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> não produtores de ESBL_____	<b>59</b>
 <b>Figura A</b> – Exemplo dos dados demográficos, disponíveis na base de dados criada, relativos a infeções do trato urinário de pacientes do Centro Hospitalar do baixo Vouga, EPE – Hospital Infante D. Pedro_____	 <b>94</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

---

**Tabela 1** – Diferentes tipos de patologias do trato urinário e principais características\_\_\_ **8**

**Tabela 2** – Terapia antimicrobiana recomendada para o tratamento de infecções do trato urinário\_\_\_\_\_ **9**

**Tabela 3** – Percentagens de susceptibilidade de bactérias uropatogénicas a antibióticos mais frequentemente utilizados\_\_\_\_\_ **10**

**Tabela 4** - Evolução da classificação molecular e funcional das  $\beta$ -lactamases\_\_\_\_\_ **18**

**Tabela 5** - Classificação das  $\beta$ -lactamases bacterianas\_\_\_\_\_ **19**

**Tabela 6** – Diferentes famílias e grupos de ESBL, país de origem e espécie bacteriana onde foram detetadas pela 1ª vez\_\_\_\_\_ **22**

**Tabela 7** – Avaliação do crescimento bacteriano em CLED\_\_\_\_\_ **41**

**Tabela 8** – Distribuição dos microrganismos isolados em função do resultado do teste ESBL\_\_\_\_\_ **53**

**Tabela A** – Composição das cartas de identificação para microrganismos Gram-negativos (GNI)\_\_\_\_\_ **90**

**Tabela B** – Composição da carta de sensibilidade antimicrobiana para microrganismos Gram-negativos (carta AST-N192)\_\_\_\_\_ **91**

**Tabela C** - Composição da carta de sensibilidade antimicrobiana para microrganismos Gram-negativos (carta AST-N222)\_\_\_\_\_ **92**

## ABREVIATURAS

---

<b>AES</b>	<i>Advanced Expert System</i>
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>AMC</b>	Amoxicilina/Ácido clavulânico
<b>ATM</b>	Aztreonam
<b>CAZ</b>	Ceftazidima
<b>CLED</b>	<i>Cystine Lactose Eletrolyte Deficient</i>
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<b>CMI</b>	Concentração mínima inibitória
<b>CRO</b>	Ceftriaxona
<b>CTX</b>	Cefotaxima
<b>CT/CTL</b>	Cefotaxima/Cefotaxima+Ácido clavulânico
<b>EDTA</b>	Ácido etileno diamino tertracético
<b>ESBL</b>	$\beta$ -lactamases de espectro estendido
<b>ESCMID</b>	<i>European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases</i>
<b>GNI</b>	Identificação de Gram-negativo
<b>HIP</b>	Hospital Infante D. Pedro
<b>IC</b>	Infeções comunitárias
<b>IDSA</b>	<i>Infectious Diseases Society of America</i>
<b>IN</b>	Infeções nosocomiais
<b>ITU</b>	Infeção do trato urinário
<b>OMPs</b>	<i>Outer membrane proteins</i>
<b>UFC/ml</b>	Unidades formadoras de colónias por mililitro
<b>PBPs</b>	<i>Penicillin binding proteins</i>

<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>RFLP</b>	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
<b>SPSS</b>	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
<b>SSCP</b>	<i>Single-strand conformational polymorphism</i>
<b>TSA</b>	Teste de sensibilidade aos antibióticos
<b>TZ/TZL</b>	Ceftazidima/Ceftazidima+Ácido clavulânico

# I. INTRODUÇÃO

---



O universo bacteriano dispõe de vários mecanismos de resistência aos antibióticos, no entanto, a produção de  $\beta$ -lactamases constitui a vertente mais marcante dessa mesma resistência (1). A produção natural de  $\beta$ -lactamases ocorreu desde sempre, como consequência das interações entre diferentes seres microbiológicos como bactérias e fungos (2). Desde os anos 40, aquando da introdução das penicilinas no uso clínico, começaram a ser isoladas  $\beta$ -lactamases capazes de hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico dos antibióticos, inativando-as (3). À medida que novos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos foram sintetizados e introduzidos na rotina hospitalar, foram surgindo também novas  $\beta$ -lactamases (4). Hoje em dia, a lista de  $\beta$ -lactamases é muito extensa e encontra-se continuamente em expansão (1). Várias décadas após a identificação dos primeiros casos de resistência aos antibióticos, este tema continua a constituir um desafio global em termos de saúde pública (1, 2).

O uso exagerado e indiscriminado de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos tem sido o principal fator estimulante da produção de  $\beta$ -lactamases, em particular de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) (4, 5). Este tipo de  $\beta$ -lactamases representa um dos mais importantes mecanismos de resistência em bactérias da família *Enterobacteriaceae*, sendo os plasmídeos apontados como os principais responsáveis pela disseminação deste tipo de resistência (2). As bactérias desta família estão na origem da maioria das infeções do trato urinário (ITU), sendo estas infeções uma das mais prevalentes em todo o mundo (6, 7). Tal facto representa um enorme desafio para os profissionais de saúde pública, epidemiologistas e equipas de controlo de infeção.

Consequentemente são de extrema importância os estudos locais, de modo a conhecer melhor as resistências dos microrganismos em questão e a realidade de cada instituição, de modo a otimizar recursos e a estabelecer protocolos de tratamento mais adequados.





## **II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---



## 2.1. Infecções do trato urinário

As infecções do trato urinário (ITU) são uma das causas mais comuns de hospitalização e frequentemente também são adquiridas por pacientes internados por outras patologias (6, 7). Uma infecção do trato urinário é definida como a colonização microbiana da urina e/ou invasão bacteriana dos tecidos de qualquer estrutura do trato urinário, com sinais de resposta imune e inflamatória por parte do hospedeiro (6). Estas infecções são encontradas com maior frequência em mulheres devido a alguns fatores anatómicos do aparelho reprodutor feminino quando comparado com o masculino, como por exemplo: extensão da uretra e colonização da região periuretral (8, 9).

Uma infecção do trato urinário é considerada não complicada quando ocorre em pacientes que apresentam um aparelho urinário sem alterações estruturais e funcionais, e a infecção é adquirida fora do ambiente hospitalar (9-11). Por outro lado, as infecções do trato urinário são consideradas complicadas quando existe alguma anomalia no trato urinário ou presença de outro fator que aumente a susceptibilidade de infecção (9). As causas mais comuns de uma ITU complicada são: transplante de rins, imunossupressão, glicosúria, gravidez, anomalia maligna no trato urinário, cateterização, esclerose múltipla, diabetes mellitus, espinha bífida, obstrução e doença da próstata (9). Numa ITU não complicada, os microrganismos mais frequentemente isolados são bactérias Gram-negativas, sendo a *Escherichia coli* a mais comum (10, 11). Em pacientes que apresentam uma ITU complicada podem estar presentes outras espécies que normalmente apresentam uma menor virulência para o trato urinário, como por exemplo, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus* ou *epidermidis*, *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia* spp. (10).

Os sintomas das infecções do trato urinário dependem não só da intensidade da reação inflamatória mas também do local de infecção e da idade do paciente (10). O espectro clínico destas infecções é muito amplo e o diagnóstico pode incluir várias condições (tabela 1): cistite, pielonefrite, uretrite, prostatite, bacteriúria assintomática e urosepsis (10, 12-14). Os microrganismos podem alcançar o trato urinário por via hematogénica ou linfática, mas inúmeras evidências clínicas e experimentais apontam para o facto de que a maioria destas infecções ocorre por via ascendente, a partir da área periuretral, por bactérias da flora intestinal (11, 12, 15, 16).

**Tabela 1** – Diferentes tipos de patologias do trato urinário e principais características (*adaptado de (9)*)

Tipo de patologia do trato urinário	Principais características
<b>Cistite</b>	A aderência da bactéria à bexiga leva ao diagnóstico de cistite bacteriana, ou infecção do trato urinário inferior. Está associada à disúria e hematúria. Sintomas sistêmicos como febre, náuseas e vômitos, embora raros, também podem estar presentes. É o tipo mais comum de ITU.
<b>Pielonefrite</b>	É uma infecção que envolve o parênquima renal. É também denominada de infecção do trato urinário superior ou nefrite intersticial bacteriana, pois, reflete alterações renais anatômicas e/ou estruturais, provocadas por um processo inflamatório agudo. Febre, vômitos e choques sépticos são sintomas frequentes.
<b>Uretrite</b>	É a inflamação da uretra, e as uretrites mais comuns são transmitidas sexualmente por microrganismos, como por exemplo, <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Mycoplasma genitalium</i> . Embora seja assintomática, normalmente está presente disúria e descarga uretral.
<b>Prostatite</b>	É a inflamação da próstata e representa a ITU mais frequente nos homens. Pode ser aguda ou crônica, o que depende da duração dos sintomas. É acompanhada de dor escrotal ou perianal, e disúria.
<b>Bacteriúria Assintomática</b>	Representa a presença de bactérias na urina. É uma condição clínica mais comum no sexo feminino e em idosos, e na maioria dos casos a terapia antimicrobiana não é recomendada. Os pacientes não apresentam qualquer sintoma urinário. Pode ser resultado de contaminação na colheita da urina.
<b>Urosepsis</b>	É uma infecção secundária grave que ocorre quando uma ITU se espalha para a corrente sanguínea. Presença de bactérias no sangue. Quando esta patologia não é tratada a tempo, pode ser potencialmente fatal.

A terapia antimicrobiana aplicada nas infecções do trato urinário depende de diversos fatores, nos quais estão incluídos: a idade do paciente, o grau de toxicidade da infecção, a presença de vômitos, a duração da febre e a resistência antimicrobiana existente

(10, 17). De acordo com as *guidelines* de referência da “*Infections Diseases Society of America*” (IDSA) e da “*European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*” (ESCMID) a terapia antimicrobiana recomendada para o tratamento de infecções do trato urinário está resumida na tabela 2.

**Tabela 2** – Terapia antimicrobiana recomendada para o tratamento de infecções do trato urinário (*adaptado de (13,14)*)

Diagnóstico	Agente patogénico/espécie mais comum	Terapia antimicrobiana
Cistite	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella spp.</i> <i>Proteus spp.</i> <i>Staphylococcus spp.</i>	Trimetoprim/Sulfametoxazole Fluoroquinolonas Fosfomicina trometamol Pivmecilinam Nitrofurantoína
Pielonefrite	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella spp.</i> <i>Proteus spp.</i> <i>Enterobacter spp.</i> Outras <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Staphylococcus spp.</i> <i>Candida spp.</i>	Fluoroquinolonas Cefalosporinas de 3ª geração Aminopenicilinas Aminoglicosídeos Carbapenemos Anfotericina B
ITU nosocomial	<i>Klebsiella spp.</i> <i>Proteus spp.</i>	Cefalosporinas de 2ª e 3ª geração Aminoglicosídeos
Prostatite	<i>Escherichia coli</i> Outras <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Pseudomonas spp.</i>	Fluorquinolonas Cefalosporinas 3ª geração
Urosepsis	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter spp.</i> <i>Serratia spp.</i> <i>Proteus spp.</i> Outras <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Pseudomonas spp.</i>	Cefalosporinas 3ª geração Fluorquinolonas Carbapenemos Aminoglicosídeos β-lactâmico/Inibidor das β-lactamases

Tal como acontece com todas as infecções bacterianas, a taxa de resistência aos antibióticos entre as bactérias uropatogénicas tem aumentado cada vez mais (9, 10). Estão apresentadas na tabela 3 as susceptibilidades de algumas destas bactérias a antibióticos normalmente utilizados no tratamento de infecções do trato urinário (9). Por exemplo, a

espécie *Escherichia coli* é frequentemente resistente a penicilinas e cefalosporinas orais, mas apresenta sensibilidade à nitrofurantoína e quinolonas (9).

**Tabela 3** – Percentagens de susceptibilidade de bactérias uropatogénicas a antibióticos mais frequentemente utilizados (*adaptado de (9)*)

	Amoxicilina	Cefradina	Trimetoprim	Nitrofurantuína	Ciprofloxacina
<i>Escherichia coli</i>	51%	79%	73%	96%	98%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1%	72%	85%	16%	95%
<i>Proteus mirabilis</i>	73%	5%	58%	0%	87%

A espécie *Klebsiella pneumoniae* apresenta resistência natural às penicilinas, como é o caso da amoxicilina, ou seja, é uma característica permanente da espécie (9). No entanto, existem dados na literatura que indicam que a espécie *Klebsiella pneumoniae* pode apresentar 1% de susceptibilidade à amoxicilina (9, 18).

## 2.2. *Enterobacteriaceae*

Espécies da família *Enterobacteriaceae* são responsáveis por cerca de 70% a 90% das infeções do trato urinário, tanto de origem hospitalar (nosocomiais) como comunitárias (8). As *Enterobacteriaceae* são agentes patogénicos capazes de provocar inúmeros géneros de infeções no Homem, por apresentarem complexos fatores de virulência e possuírem a capacidade de resistir a determinados agentes antimicrobianos (2).

*Enterobacteriaceae* é uma família de bacilos Gram-negativos muito abundante, que inclui uma vasta gama de bactérias patogénicas, como os géneros *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Morganella* spp., *Proteus* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp., *Yersinia* spp. entre outros (19). As espécies desta família caracterizam-se por possuírem na sua composição uma parede celular do tipo Gram-negativo, crescem em condições aeróbias ou anaeróbias, são imoveis ou móveis, e não formam esporos (19, 20). Crescem rapidamente em meios simples, e muitas vezes com apenas uma fonte de energia de um único carbono (19). Do ponto de vista bioquímico caracterizam-se pela capacidade de fermentarem a glucose,

reduzirem nitratos a nitritos, e são oxidase negativa (19, 20). São bactérias ubiquitárias na natureza, ou seja, são encontradas na água do solo e plantas, ou podem ser colonizadoras, por exemplo, do trato intestinal do homem e animais (19).

Espécies da família *Enterobacteriaceae* são isoladas com muita frequência em todos os tipos de produtos biológicos (5). Esta família de microrganismos abrange um grupo importante de agentes patogênicos oportunistas que possuem diversos fatores de virulência (21). Estão implicados em processos infecciosos no ambiente hospitalar e na comunidade, mais frequentemente nas infecções do trato urinário, infecções respiratórias e infecções intra-abdominais (21, 22).

*Escherichia coli* é a espécie mais comum presente em infecções do trato urinário, sendo que possui fímbrias e adesinas que funcionam como fatores de virulência (2). Esta estirpe está presente em infecções de feridas, infecções intestinais, pneumonias em pacientes imunodeprimidos e septicemias (7, 21). Estirpes de *Klebsiella pneumoniae* são responsáveis por infecções do trato urinário, pneumopatias e septicemias nosocomiais (19). Seguidas de *Escherichia coli*, estirpes de *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., e *Proteus* spp. são as mais encontradas em infecções comunitárias do trato urinário (8). De forma similar, as bacteriúrias hospitalares são causadas na sua maioria por microrganismos de origem endógena, podendo também ser originadas por microrganismos do ambiente hospitalar (7). De acordo com a literatura, os agentes mais comuns em bacteriúrias hospitalares são as espécies *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, e os géneros *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Enterococcus* spp. e *Providencia* spp. (7).

Foram reportados dados no Relatório Nacional de Prevalência de Infecção de 2009 em Portugal, que mostram que o principal microrganismo associado a infecções nosocomiais (IN), ou seja, associado a qualquer tipo de infecção adquirida após a entrada do paciente no hospital, é a *Escherichia coli*, sendo responsável por 14,5% dessas infecções (23). Em relação às infecções comunitárias (IC), isto é, infecções presentes no ato de admissão do paciente no hospital, sem estarem relacionadas com internamento anterior no mesmo hospital, este relatório nacional mostra que a espécie *Escherichia coli* é responsável por 24,1% de infecções comunitárias (23). Pelo contrário, a *Klebsiella pneumoniae* encontra-se mais associada a IN (7.9%) do que a IC (6.1%) (23).



Para combater estas infeções recorre-se ao uso de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, que por vezes se torna excessivo e indiscriminado, sendo a principal causa do aparecimento de determinados tipos de resistências (24, 25). A resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em espécies da família *Enterobacteriaceae* é um dos principais problemas a nível hospitalar, nomeadamente a produção de ESBL, que tem sido alvo de uma constante investigação (2, 5, 24).

### 2.3. Antibióticos

Os antibióticos são compostos que em pequenas quantidades, são capazes de inibir o crescimento bacteriano e a multiplicação, tendo assim um efeito bacteriostático ou bactericida (26). Podem ser classificados em diferentes grupos em função da ação na estrutura alvo da célula bacteriana, diferenciando-se em inibidores de síntese proteica, inibidores da membrana citoplasmática, podem interferir com a síntese de ácidos nucleicos e com a síntese da parede celular, ou apresentarem atividade antimetabólica (27). Este tipo de atuação seletiva de alvo minimiza o efeito tóxico das drogas antimicrobianas sobre a espécie humana (27).

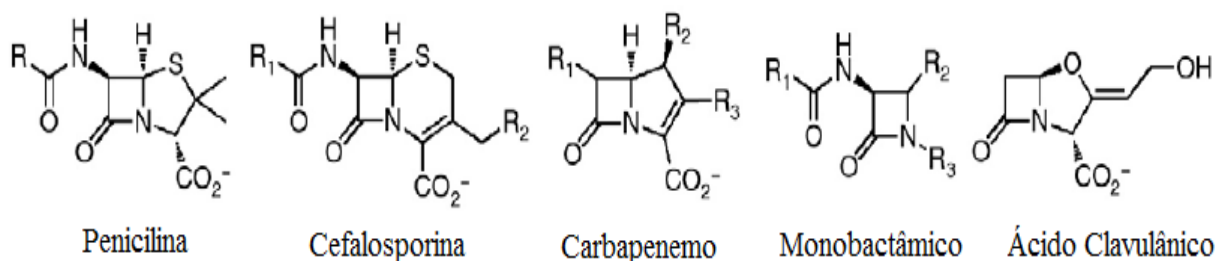
A rápida emergência da resistência aos antibióticos entre os microrganismos patogénicos hospitalares é uma ameaça séria para a gestão de doenças infecciosas (28). Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são os agentes antimicrobianos mais utilizados na terapêutica de infeções, nomeadamente na clínica hospitalar e ambatório devido à sua baixa toxicidade, largo espectro e ação bactericida (19).

#### 2.3.1. Definição e classificação dos antibióticos $\beta$ -lactâmicos

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos destacam-se pela sua relevância na terapêutica clínica (5). Este facto deve-se, essencialmente, a uma propriedade importante: ausência de toxicidade para organismos eucariotas, pois estes antibióticos possuem como local de ação uma estrutura que existe unicamente em bactérias – o peptidoglicano (26).

Estes antibióticos pertencem a uma família que se caracteriza por possuir um anel  $\beta$ -lactâmico constituído por três átomos de carbono e um átomo de azoto com radicais alteráveis (19). Esta família é constituída por penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos, monobactâmicos e inibidores das  $\beta$ -lactamases (ex: ácido clavulânico) (1). O anel  $\beta$ -lactâmico encontra-se combinado com um anel tiazolidina nas penicilinas ou com um anel dihidrotiazina nas cefalosporinas (19). Como se pode ver na figura 1, para além do núcleo elementar das penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos e monobactâmicos, encontram-se na sua estrutura vários radicais ( $R$ ,  $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$ ), cuja composição modifica o espectro antibacteriano e pode tornar o antibiótico sensível ou resistente (1). A penicilina foi o primeiro membro desta classe a ser obtido, a partir do género *Penicillium*, e mais tarde foram obtidos  $\beta$ -lactâmicos derivados do género *Streptomyces* (19).

A integridade do anel  $\beta$ -lactâmico é imprescindível à sua atividade, a qual consiste em inativar um conjunto de transpeptidases que catalisam ligações cruzadas na fase final da síntese do peptidoglicano (19). A hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico implica a inativação do antibiótico (1).



**Figura 1** – Estruturas moleculares da família dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (*adaptado de (1)*)

### 2.3.2. Mecanismo de ação dos antibióticos $\beta$ -lactâmicos

A célula bacteriana para crescer e dividir-se necessita de enzimas autolíticas e enzimas com funções biossintéticas (glicosiltransferases, transpeptidases e carboxipeptidases), localizadas no folheto externo da membrana citoplasmática (19, 29). Estas enzimas funcionam como alvos dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e são designadas por

*Penicillin Binding Proteins* (PBPs) (1, 19, 29). As PBPs catalisam o “*cross-linking*” da parede do peptidoglicano que rodeia a bactéria, mantendo a integridade da sua forma e da sua estrutura (29).

A penetração dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos na célula bacteriana está diretamente relacionada com a parede celular (19). Nas bactérias Gram-positivas, o peptidoglicano é o principal constituinte da parede celular, surge como um heteropolímero de composição complexa que confere resistência mecânica à parede (19). Neste caso, é do lado externo da membrana citoplasmática que se encontram os alvos dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos – as PBPs (29). Por outro lado, nas bactérias Gram-negativas a parede celular encontra-se mais estratificada, sendo constituída por lipopolissacarídeos e fosfolípidos, onde se inserem poros constituídos por porinas, sob as quais se encontra a camada de peptidoglicano (30).

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos atuam na fase final da biossíntese do peptidoglicano, pela inibição das PBPs que ficam sem atividade fisiológica (1, 19). Estes antibióticos têm como função parar a síntese do peptidoglicano, libertarem ou ativarem enzimas autolíticas que interrompem as áreas mais enfraquecidas da parede, e por fim, provocarem a lise osmótica através da passagem de água da membrana citoplasmática para o interior hipotónico da célula (19). Assim, as bactérias ficam impedidas de se multiplicarem e lisam por falta de estabilidade na sua parede celular (30).

## **2.4. Origem da resistência aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos**

As bactérias podem manifestar resistência a determinados antibióticos através de uma variedade de mecanismos (31, 32). Assim, em termos de resistência os organismos podem apresentar fundamentalmente um de três fenótipos: resistência intrínseca, resistência adquirida ou susceptibilidade (32). A resistência intrínseca é descrita como sendo um fenómeno natural que é exibido por todos os membros de uma determinada espécie (19, 32). A resistência adquirida aos antibióticos, por sua vez, pode resultar da mutação de genes reguladores ou estruturais, da aquisição de genes de resistência veiculados ou da combinação de ambos os mecanismos (19, 32). O fenótipo resultante da resistência adquirida não irá estar presente em todos os indivíduos da mesma espécie, existirá apenas nos indivíduos de uma linhagem bacteriana que derive de um organismo

suscetível (19). A aquisição de genes de resistência faz-se, muitas vezes, através de elementos móveis, tais como plasmídeos, transposões ou integrões (32). Muitos dos genes que codificam as  $\beta$ -lactamases surgem como exemplo de genes que são disseminados por plasmídeos, os quais podem ser facilmente adquiridos por diversas bactérias patogênicas (transferência horizontal) (32). Naturalmente, a susceptibilidade aos antibióticos resulta da ausência total de mecanismos de resistência que possibilitem a sobrevivência das bactérias na presença de determinados compostos (19, 32).

Algumas espécies de bactérias são naturalmente resistentes a uma ou mais classes de agentes antimicrobianos (31). Em tais casos, todas as estirpes dessa espécie são do mesmo modo resistente a todos os membros dessas classes de antibacterianos (31). De maior preocupação são os casos de resistência adquirida, em que as populações de bactérias inicialmente sensíveis se tornam resistentes a um agente antibacteriano e vão proliferar sob a pressão seletiva da utilização desse agente (31, 32). Assim, são vários os mecanismos de resistência antimicrobiana que permitem a disseminação de uma variedade de microrganismos patogênicos.

## **2.5. Mecanismos de resistência bacteriana aos $\beta$ -lactâmicos**

A introdução de antibióticos na prática clínica permitiu o controle efetivo de várias doenças infecciosas. No entanto, rapidamente diversas bactérias patogênicas tornaram-se resistentes a esses agentes antimicrobianos (33). Tornou-se uma enorme ameaça a partir do momento em que o Homem começou a utilizar clinicamente os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (1).

As bactérias podem desenvolver resistência aos  $\beta$ -lactâmicos por vários mecanismos, podendo estes ocorrer em simultâneo no mesmo organismo (1, 33, 34). A resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos pode resultar de modificações do alvo do antibiótico (as PBP), impermeabilidade da membrana citoplasmática, existência de proteínas de efluxo, ou ainda inativação enzimática do antibiótico (1, 27).

Um dos mecanismos através dos quais as bactérias se tornam resistentes aos antibióticos surge através da modificação do alvo do antibiótico, nomeadamente, através

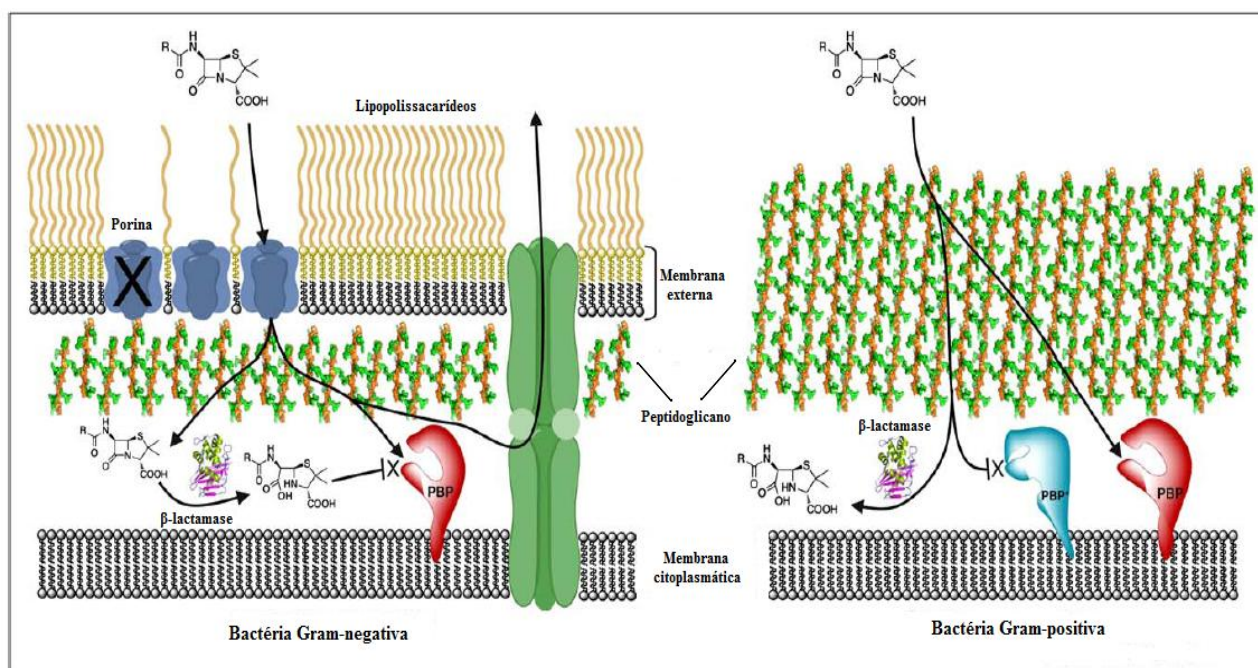
de substituições de aminoácidos na proteína que constitui o alvo dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, as PBPs (1, 29, 33, 34). Estas proteínas são estruturas químicas complexas formadas por cadeias lineares de glicano, têm na sua composição compostos de N-acetil murâmico e unidades de N-acetil glucosamina (29). Na maioria dos casos, a proteína torna-se menos suscetível à ligação com o agente antimicrobiano (29, 34). Embora este facto tenha sido observado em bactérias Gram-negativas, o mecanismo de resistência é particularmente notório em bactérias Gram-positivas (34).

Outro dos mecanismos de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos é a existência de bombas de efluxo, pois, as bactérias possuem bombas de efluxo biológicas que estão implicadas na libertação de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, entre outras substâncias, quer do periplasma quer do citoplasma para o meio extracelular (32). Assim sendo, o efluxo do agente antimicrobiano pode conferir um nível de resistência residual (35). Este mecanismo pode não ser suficiente para expressar resistência ao nível da clínica, contudo, em conjunto com outros mecanismos pode estar na origem de falências terapêuticas (32). A especificidade do antibiótico pode variar em função da bomba de efluxo, e por isso, a resistência surge pelo aumento da síntese das proteínas que, no seu conjunto constituem a bomba (35). As bombas de efluxo podem ter afinidade para diversos antibióticos, pelo que estão frequentemente associadas à multirresistência (32, 35).

A resistência aos antibióticos está muitas vezes associada à diminuição da permeabilidade que ocorre na membrana externa das bactérias Gram-negativas (32). O fluxo de moléculas para o interior da célula é assegurado através de complexos de proteínas de membrana, denominados OMPs (*Outer Membrane Proteins*), os quais formam canais (27). A passagem de moléculas para o interior da célula é influenciada por vários fatores, como a sua carga, estrutura e dimensão (27). Os antibióticos são algumas das moléculas que utilizam este percurso para atingir o interior da célula bacteriana ou, no caso mais específico dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, o espaço periplásmico (32). Na *Escherichia coli*, por exemplo, as proteínas OmpF, OmpC e OmpE estão vulgarmente associadas à resistência aos antibióticos (27). A perda de função destas proteínas, por mutação dos genes homónimos, pode efetivamente causar a diminuição da susceptibilidade a vários antibióticos (27, 32).

Não obstante os mecanismos acima descritos contribuírem para a resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, a degradação de antibióticos por enzimas constitui o principal mecanismo de

resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (1, 35). O anel  $\beta$ -lactâmico presente nos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos é indispensável à atividade antibacteriana, mas é suscetível de ser hidrolisado irreversivelmente por hidrolases bacterianas, as  $\beta$ -lactamases, na ligação amida do anel, tornando-o inativo (35). As  $\beta$ -lactamases, enzimas de origem cromossômica ou plasmídica, podem ser encontradas no espaço periplasmático da parede celular das bactérias Gram-negativas, enquanto nas bactérias Gram-positivas são produzidas e excretadas para o meio exterior (figura 2) (1). A concentração das  $\beta$ -lactamases no periplasma é bastante importante e pode condicionar a eficácia terapêutica, mesmo que os antibióticos sejam resistentes a essas  $\beta$ -lactamases (35). A interação  $\beta$ -lactâmico/inibidor pode não inativar o antibiótico, mas este fica impedido de atingir as PBP, condição indispensável para a sua ação antimicrobiana (1, 35).



**Figura 2** – Representação esquemática dos mecanismos de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (*adaptado de (1)*)

## 2.6. $\beta$ -lactamases

A primeira  $\beta$ -lactamase foi identificada em *Bacillus (Escherichia) coli* antes do uso clínico da penicilina (35). Num artigo publicado há mais de 70 anos, foi descrito o *Bacillus*

*coli* como “penicilase” (36). Desde então, o número de  $\beta$ -lactamases não parou de aumentar, seguindo-se a emergência e posterior disseminação de penicilinas plasmídicas identificadas em várias espécies bacterianas (35). Este facto parece ter sido devido à pressão de seleção causada pela secreção de agentes biocidas por parte de microrganismos ambientais, como fungos e bactérias, que surgiram as primeiras enzimas resistentes a agentes antimicrobianos (35, 37).

### 2.6.1. Definição e classificação das $\beta$ -lactamases

As  $\beta$ -lactamases formam um grupo heterogéneo de enzimas que são capazes de hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico de penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos e monobactâmicos (37). A eficácia das  $\beta$ -lactamases produzidas por bacilos Gram-negativos é condicionada pela sua localização, a sua eficiência hidrolítica e a quantidade enzimática produzida, o que se traduz numa maior ou menor resistência por parte destes antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (35, 37).

Ao longo de anos de investigação, foram propostas várias classificações para as  $\beta$ -lactamases, tendo cada uma delas surgido devido à necessidade de preencher falhas deixadas pelas classificações anteriores e com o objetivo de caracterizar e integrar novas  $\beta$ -lactamases (35). Estas classificações (tabela 4) dividem as enzimas de acordo com a sua estrutura molecular, perfil de hidrólise e resposta aos inibidores (35, 38, 39).

**Tabela 4** - Evolução da classificação molecular e funcional das  $\beta$ -lactamases (*adaptado de* (37))

Ano	Autor	Base da classificação
1968	Sawai <i>et al</i>	Cefalosporinas vs penicilinas como substratos.
1973	Richmond e Sykes	Perfil de substrato alargado e sugestão de cinco grupos (Ia-d, II, III, IV e V).
1976	Richmond e Matthew	Distinção das enzimas plasmídicas através do ponto isoeléctrico.
1980	Ambler	Separação das enzimas em quatro classes moleculares (A-D).
1981	Mitsuhashi e Inoue	Adição da categoria “ $\beta$ -lactamase que hidrolisa cefuroxima”.
1989	Bush	Expansão do perfil de substratos, inserção da reação com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), correlação entre classificação molecular e funcional.
1995	Bush, Jacoby e Medeiros	Expansão do esquema de Bush e uso da estrutura molecular e da sequência nucleotídica. Sugestão de classificação em quatro grupos (1-4) com base no espectro de atividade.

Em posição de destaque, existem dois esquemas de classificação principais para categorizar as  $\beta$ -lactamases: as classes de A a D propostas por Ambler (40), baseadas na homologia da sequência de aminoácidos, e os grupos de 1 a 4 propostos por Bush-Jacoby-Medeiros (41), baseados no perfil do substrato e inibidor (tabela 5).

**Tabela 5** - Classificação das  $\beta$ -lactamases bacterianas (*adaptado de (40)*)

Grupo Bush-Jacoby-Medeiros	Classe Molecular (Ambler)	Substrato preferido	Perfil de inibição		Enzimas representativas
			Ácido Clavulânico	EDTA	
1	C	Cefalosporinas	-	-	AmpC, MIR-1
2 <sup>a</sup>	A	Penicilinas	+	-	Penicilinas de Gram-positivos
2b	A	Penicilinas, Cefalosporinas ( <i>broad-spectrum</i> )	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penicilinas, Cefalosporinas ( <i>extended-spectrum</i> ), Monobactâmicos	+	-	TEM-3 a TEM-26, SHV-2 a SHV-6, K1 de <i>Klebsiella oxytoca</i>
2br	A	Penicilinas	±	-	TEM-30 a TEM-36, TRC-1
2c	A	Penicilinas, Carbenicilinas	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	D	Penicilinas, Cloxacilina	±	-	OXA-1 a OXA-11, PSE-2
2e	A	Cefalosporinas	+	-	Cefalosporinase induzível de <i>Proteus vulgaris</i>
2f	A	Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenemos	+	-	NMC-A de <i>Enterobacter cloacae</i> , SME-1 de <i>Serratia marcescens</i>
3	B	Maioria dos $\beta$ -lactâmicos, incluindo Carbapenemos	-	+	L1 de <i>Xantomonas maltophilia</i> , CcrA de <i>Bacteroides fragilis</i>
4	ND*	Penicilinas	-	?	Penicilinase de <i>Pseudomonas cepacia</i>

\*ND – Não determinado



Segundo Ambler, as  $\beta$ -lactamases dividem-se em quatro classes moleculares: A, B, C e D (40). As  $\beta$ -lactamases pertencentes às classes A, C e D apresentam todas serina no local ativo das enzimas, enquanto que a classe B é constituída por metalo- $\beta$ -lactamases, sendo o zinco o metal presente no local ativo (35, 40). No entanto, a classificação proposta por Bush, Jacoby e Medeiros em 1995 tem sido mais usada (41). Trata-se de uma classificação funcional, baseada nas características estruturais e bioquímicas, dividindo as  $\beta$ -lactamases em quatro grupos (1-4) e vários subgrupos (a-f) de acordo com os seus substratos e sensibilidade aos inibidores (41).

A primeira  $\beta$ -lactamase de origem plasmídica identificada em Gram-negativos, foi a TEM-1, descoberta na Grécia em meados de 1960 a partir de uma amostra clínica de *Escherichia coli* isolada de uma doente chamada Temoniera, daí a sua designação TEM (28, 35). Outra  $\beta$ -lactamase comum é a SHV-1, principalmente encontrada em *Klebsiella pneumoniae*, tendo o seu nome derivado do termo “*sulphydryl reagent variable*” codificada em plasmídeos em *Escherichia coli* e no cromossoma em *Klebsiella pneumoniae* (28, 35). TEM e SHV são  $\beta$ -lactamases comuns detetadas na clínica em isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, presentes em infeções do trato urinário, trato respiratório e infeções da corrente sanguínea (35).

A denominação um pouco anárquica das  $\beta$ -lactamases, de acordo com o nome do doente (TEM); de acordo com reagentes (SHV); de acordo com o substrato (OXA- atividade contra oxacilina); pelas suas propriedades bioquímicas (CTX- atividade contra cefotaxima), ou com o nome do hospital em que foi isolada (MIR- Miriam Hospital), levou à necessidade de classificar as  $\beta$ -lactamases existentes (35, 37).

Ao longo dos anos foram desenvolvidos novos compostos  $\beta$ -lactâmicos, especificamente desenhados para resistir à ação hidrolítica das  $\beta$ -lactamases, contribuindo para o aparecimento de novas variantes (28). Estas novas  $\beta$ -lactamases denominadas de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) são comuns em infeções hospitalares, nomeadamente em infeções do trato urinário, e derivam de mutações das  $\beta$ -lactamases anteriores ( $\beta$ -lactamases “narrow spectrum”: TEM-1, TEM-2 e SHV-1) (28).

## 2.7. $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL)

O desenvolvimento de cefalosporinas de espectro estendido no início de 1980 foi considerado uma grande adição ao arsenal terapêutico no combate à resistência bacteriana mediada por  $\beta$ -lactamases (35, 42). Lamentavelmente surgiram resistências em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* à ceftazidima (cefalosporina de 3ª geração) e a outras cefalosporinas, comprometendo seriamente a eficácia destes antibióticos (42).

As  $\beta$ -lactamases de espectro estendido têm a particularidade de hidrolisar penicilinas (ex: ampicilina e piperacilina), todas as cefalosporinas, como as oximinocefalosporinas (ex: ceftazidima e cefotaxima), bem como monobactâmicos (ex:aztreonam) (35, 42, 43). A produção de ESBL é mediada por plasmídeos que conferem ampla resistência aos antimicrobianos que contêm o anel  $\beta$ -lactâmico na sua estrutura (44). Estas quebram este anel, inativando assim o antibiótico (44). As espécies bacterianas produtoras de ESBL mais comuns são *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, embora a detecção destas enzimas já se tenha observado noutras espécies de *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonaceae* (42, 44, 45).

As ESBL clássicas são enzimas adquiridas, na sua maioria derivadas das TEM e SHV, geralmente mediadas por plasmídeos, predominantemente pertencentes ao grupo funcional 2be (ou classe A, segundo Ambler) (42, 43). As estirpes produtoras de ESBL são geralmente sensíveis à ação dos inibidores de  $\beta$ -lactamases, tais como o ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam (42).

A evolução destas  $\beta$ -lactamases tem sido tão grande que foi criada uma base de dados sobre  $\beta$ -lactamases (<http://www.lahey.org/Studies/>), organizada por Karen Bush e George Jacoby, cujo objetivo é tentar monitorizar e documentar todos os desenvolvimentos sobre os tipos mais comuns de  $\beta$ -lactamases com relevância clínica, e inserir as novas descobertas (46). Para caracterizar uma nova ESBL é necessário descobrir novas modificações, como mudanças na região promotora, e/ou substituições nucleotídicas, que funcionalmente devem ser “silenciosas” (46).

A classificação molecular de Ambler e a classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros são as mais frequentemente utilizadas, no entanto, mais tarde foi proposto outro sistema de classificação mais problemático que inclui as diferenças mais relevantes entre as várias categorias de ESBL (47). Assim, a classe funcional de  $\beta$ -lactamases 2be passaria

a designar-se “ESBLs classe A” (ESBL<sub>A</sub>), as AmpC mediadas por plasmídeos e OXA-ESBLs seriam denominadas “ESBLs Miscelanea” (ESBL<sub>M</sub>) e as ESBL com atividade hidrolítica contra carbapenemos seriam denominadas ESBL<sub>CARBA</sub> (47). Contudo, esta classificação proposta por Giske *et al.* 2009, não reuniu consenso e foi imediatamente revogada por Bush e colegas, que defendem que esta proposta acarreta alguns inconvenientes na definição das ESBL já que engloba  $\beta$ -lactamases classicamente não reconhecidas como ESBL (caso das carbapenemases serínicas e metalo- $\beta$ -lactamases) que apresentam mecanismos de hidrólise e de inativação distintos (48).

Ao longo dos anos têm sido descritas várias classificações para os diferentes grupos de ESBL, classificados de acordo com as suas sequências de aminoácidos e com a sua origem (tabela 6), tendo sido a maioria delas descobertas na Europa (49).

**Tabela 6** – Diferentes famílias e grupos de ESBL, país de origem e espécie bacteriana onde foram detetadas pela 1ª vez (*adaptado de* (48))

ESBL	$\beta$ -lactamase progenitora	País de origem	Espécie bacteriana onde se detetou pela 1ª vez
<b>Elevada prevalência</b>			
TEM	TEM-1, -2 (>90%) <sup>a</sup>	França (1985) <sup>b</sup>	Enterobacteriaceae
Grupo CTX-M-1	KLUC <i>Kluyvera cryocrescens</i> (85%) <sup>a</sup>	Alemanha (1989) <sup>c</sup>	<i>Escherichia coli</i>
Grupo CTX-M-2	KLUA <i>Kluyvera ascorbata</i> (80–100%) <sup>a</sup>	Japão (1986) <sup>c</sup> / Argentina (1989) <sup>c</sup>	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella spp.</i>
Grupo CTX-M-8	KLUG <i>Kluyvera georgiana</i> (95%) <sup>a</sup>	Brasil (1996–1997) <sup>c</sup>	<i>Citrobacter amalonaticus</i> , <i>Enterobacter spp.</i>
Grupo CTX-M-9	KLUG <i>K. georgiana</i> (80%) <sup>a</sup>	Espanha (1994) <sup>c</sup>	<i>E. coli</i>
Grupo CTX-M-25	ND	Canadá (2000) <sup>c</sup>	<i>E. coli</i>
OXA	OXA-10 (PSE-2) (>90%) <sup>a</sup>	Turquia (1991) <sup>c</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PER		França (1991) <sup>c</sup>	<i>P. aeruginosa</i>
VEB	PER (39%) <sup>a</sup>	França (1996) <sup>c</sup>	<i>E. coli</i>
<b>Baixa prevalência</b>			
TLA	CME-1 (50%) <sup>a</sup> <i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	México (1991) <sup>c</sup>	<i>E. coli</i>
BES	YENT (51%) <sup>a</sup> <i>Yersinia enterocolitica</i>	Brasil (1996) <sup>c</sup>	<i>Serratia marcescens</i>
GES-1	YENT (36%) <sup>a</sup> <i>Y. enterocolitica</i>	França (1998) <sup>c</sup>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
IBC	YENT (40%) <sup>a</sup> <i>Y. enterocolitica</i>	Grécia (1999) <sup>c</sup>	<i>E. cloacae</i>
BEL	GES-1 (50%) <sup>a</sup>	Bélgica (2004) <sup>c</sup>	<i>P. aeruginosa</i>

ND: Não determinado;

a: Homologia da sequência de aminoácido (%);

b: Data da publicação;

c: Data de isolamento.

Até ao início do século XXI a maioria das ESBL detetadas eram do tipo TEM e SHV, e os isolados produtores destas enzimas estavam relacionados na maioria dos casos com infeções nosocomiais (50). A prevalência de estirpes produtoras de ESBL era mais elevada em *Klebsiella pneumoniae* do que em *Escherichia coli* (49-51). Após o início deste século, a maioria dos isolados produtores de ESBL passaram a pertencer à espécie *Escherichia coli* a expressarem  $\beta$ -lactamases do tipo CTX-M, sendo estes isolados principalmente responsáveis por infeções do trato urinário adquiridas na comunidade (21, 42, 51).

### **2.7.1. Principais tipos de ESBL (TEM, SHV, CTX-M e OXA)**

#### **$\beta$ -lactamases TEM**

As  $\beta$ -lactamases do tipo TEM fazem parte de um vasto grupo de  $\beta$ -lactamases que contemplam uma série de enzimas resultantes de mutações pontuais na primeira  $\beta$ -lactamase detetada no início dos anos 60, a TEM-1 (44). A TEM-2, derivada da TEM-1, apresenta apenas uma única substituição de aminoácidos em relação à  $\beta$ -lactamase original, o que causou mudanças no ponto isoelectrico mas não modificou o perfil de substrato (41). A TEM-13 tem um perfil hidrolítico semelhante a TEM-1 e TEM-2, no entanto, não fazem partes das ESBL (52).

A primeira  $\beta$ -lactamase do tipo TEM mediada por plasmídeos a apresentar fenótipo ESBL foi a TEM-3, reportada pela primeira vez em 1989 (44, 49). Esta difere da TEM-2 pela substituição de dois aminoácidos (52). Assim, as mutações responsáveis pela extensão de espectro ocorrem por substituição de glutamato por lisina na posição 104, arginina por serina na posição 164, glicina por serina na posição 238 e glutamato por serina na posição 240 (44). As propriedades catalíticas das enzimas TEM variam de acordo com as substituições aminoacídicas que afetam diretamente o sítio ativo e, portanto, resultam das alterações nucleotídicas que ocorrem em posições específicas do gene *bla*<sub>TEM</sub> que as codifica (43).

Embora as  $\beta$ -lactamases do tipo TEM sejam mais frequentemente encontradas em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* podem também ser detetadas noutras bactérias

Gram-negativas como *Enterobacter* spp, *Morganella morganii*, *Proteus* spp, *Salmonella* spp e *Pseudomonas aeruginosa* (44).

### **β-lactamases SHV**

As enzimas da família SHV estão inseridas nos grupos 2b, 2be e 2br da classificação Bush-Jacoby-Medeiros, de acordo com os antibióticos β-lactâmicos que hidrolisam (41). A SHV-1 é a β-lactamase mais comum encontrada em isolados de *Klebsiella pneumoniae*, e é responsável por 20% da resistência à ampicilina nesta espécie (44). Em muitas estirpes desta espécie, o gene *bla<sub>SHV-1</sub>* ou outro gene relacionado estão integrados no cromossoma bacteriano (44).

A maioria das enzimas tipo SHV são ESBL, produzidas principalmente por isolados de *Klebsiella pneumoniae* mas também já foram observadas em *Citrobacter diversus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (44). São particularmente importantes na disseminação de resistências em isolados clínicos na Europa e América, sendo as enzimas SHV-5 e SHV-12 das mais comuns deste grupo (53). A maioria das variantes de β-lactamases SHV com fenótipo do tipo ESBL são caracterizadas pela substituição de serina por glicina na posição 238, contudo, algumas variantes relacionadas com a SHV-5 também têm uma substituição de lisina por glutamato na posição 240 (44). Assim, o resíduo de serina na posição 238 é responsável pela hidrólise da ceftazidima, no entanto, a lisina na posição 240 promove a hidrólise da cefotaxima (53).

### **β-lactamases CTX-M**

Descobertas mais tarde, surgiram as β-lactamases CTX-M, uma nova família de ESBL mediadas por plasmídeos que hidrolisam preferencialmente cefotaxima, daí o seu nome (45, 54). São particularmente encontradas em isolados de *Salmonella enterica* e *Escherichia coli*, mas também estão presentes noutras espécies de *Enterobacteriaceae* (44). As β-lactamases CTX-M derivam de enzimas cromossomais, por isso, não se encontram relativamente relacionadas com as β-lactamases TEM ou SHV, estimando-se que a sua homologia seja apenas de 40% (44, 55). Posteriormente foi reportado que este grupo terá surgido a partir de transferência genética horizontal e subsequente mutação do gene cromossômico *AmpC* (Ampicilinase de classe C) de *Kluyvera ascorbata* (designado de Klu-1 e Klu-2) (44, 56). A partir de análises de sequência comparativa e de estudos de

mutagénese, os aminoácidos essenciais envolvidos na especificidade de substrato para a hidrólise das  $\beta$ -lactamases CTX-M são: asparagina nas posições 104 e 132, serina na posição 237 e aspartato na posição 240 (42).

Os organismos que produzem  $\beta$ -lactamases CTX-M tornaram-se o tipo mais prevalente de produtores de ESBL, especialmente em países da Europa e América do Sul (45). Estas enzimas podem ser divididas em cinco grupos com base na semelhança de aminoácidos: CTX-M1, CTX-M2, CTX-M8, CTX-M9 e CTX-M25 (45, 57). Estas  $\beta$ -lactamases não se limitam apenas às infeções nosocomiais provocadas por *Klebsiella* spp., e o seu potencial de disseminação ultrapassa o ambiente hospitalar, o que conduz a uma enorme preocupação de saúde pública (44, 58). As infeções do trato urinário são tipicamente provocadas por *Escherichia coli* que expressam enzimas CTX-M, e a sua disseminação mundial deve-se à existência de elementos móveis e particularmente sequências de inserção (3, 42).

### **$\beta$ -lactamases OXA**

As enzimas de  $\beta$ -lactamases OXA são outra família crescente de ESBL, e foi designada desta forma devido à sua capacidade de hidrolisar oxacilina e cloxacilina (41, 55). As ESBL deste tipo pertencem ao grupo funcional 2d, são encontradas principalmente em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e a resistência à ceftazidima é um dos seus marcadores fenotípicos (41, 55). Estas  $\beta$ -lactamases diferem das enzimas TEM e SHV na medida em que pertencem à classe molecular D e ao grupo funcional 2f (41, 44). As  $\beta$ -lactamases OXA conferem resistência à ampicilina e à cefalotina (44).

Várias das  $\beta$ -lactamases OXA que expressam fenótipo de ESBL derivaram da enzima OXA-10, por exemplo, a OXA-14 difere da OXA-10 por um único resíduo de aminoácido (37, 44). Entre as enzimas relacionadas com a OXA-10, as variantes de ESBL têm uma das duas substituições de aminoácidos: uma asparagina por serina na posição 73, ou um aspartato por glicina na posição 157 (44).

### **Outros tipos de ESBL**

Existem outros tipos de ESBL que não pertencem às famílias mencionadas anteriormente. Por exemplo, a  $\beta$ -lactamase PER-1 (“*Pseudomonas Extended Resistance*”), foi identificada pela primeira vez em linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*, e

posteriormente, constatou-se igualmente entre isolados de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium e *Acinetobacter baumannii* (38, 44). A enzima PER-2 está diretamente relacionada com a PER-1, apresentando uma homologia aminoacídica de 86% (44). Outras  $\beta$ -lactamases semelhantes à enzima PER-1 são a VEB-1, CME-1 e TLA-1, que conferem resistência à ceftazidima e aztreonam (44). Menos comuns, existem ainda as ESBL do tipo SFO-1, que não hidrolisam cefamicinas e são inibidas pelo ácido clavulânico, e a enzima GES-1 que não está intimamente relacionada com qualquer outra  $\beta$ -lactamase mediada por plasmídeos (44).

### **2.7.2. Comportamento das ESBL e importância da sua detecção laboratorial**

As estirpes produtoras de ESBL são importantes na clínica hospitalar, na medida em que provocam o aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes, pelo facto de serem resistentes a muitas classes de antibióticos, resultando assim em infeções de difícil tratamento (59). A detecção laboratorial destas  $\beta$ -lactamases pode ser complexa e está sujeita a erros de interpretação. Embora nos testes *in vitro*, as  $\beta$ -lactamases sejam inibidas por inibidores como o ácido clavulânico, existem fatores que podem influenciar os resultados dos testes (60). Como por exemplo, a atividade da combinação de  $\beta$ -lactâmico/inibidor pode ser influenciada pelo tamanho do inóculo bacteriano e do tipo específico de ESBL presente (60).

O aumento da prevalência de espécies da família *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL cria uma grande necessidade de aplicar métodos de ensaio de laboratório para identificar com precisão a presença destas enzimas em isolados clínicos (44). A ampla e rápida distribuição geográfica das ESBL é uma ameaça com a qual os hospitais do mundo inteiro têm que lidar (46). As formas usuais de transmissão incluem a disseminação clonal da linhagem produtora de ESBL (61) ou a disseminação através de genes produtores de ESBL, genes estes que são mediados por plasmídeos e são transmitidos entre diferentes géneros de *Enterobacteriaceae* (62). Tanto a disseminação mediada por plasmídeos ou a própria multiplicação bacteriana podem ocorrer simultaneamente (61). Também se sabe

que alguns genes codificadores de ESBL residem em transposões ou integrões, fornecendo assim os meios adicionais para a sua propagação e expressão (63).

O isolamento e cuidados especiais no contato com pacientes infectados com bactérias produtoras de ESBL são pontos cruciais no controlo da disseminação destes microrganismos no ambiente hospitalar (46).

### **2.7.3. Métodos de detecção de estirpes produtoras de ESBL**

Os métodos de detecção de estirpes produtoras de ESBL nos laboratórios clínicos podem ser divididos em dois grupos fundamentais: métodos fenotípicos em que são utilizadas técnicas não moleculares para detetar a capacidade destas  $\beta$ -lactamases em hidrolisar diferentes cefalosporinas; e métodos genotípicos, que se baseiam em técnicas de biologia molecular para a detecção do gene responsável pela produção de ESBL (45, 64). Nestes laboratórios são usados principalmente métodos fenotípicos, pois, são testes de fácil execução, são rentáveis, e foram incorporados em sistemas de detecção da susceptibilidade automatizados, tornando-os amplamente acessíveis (65). No entanto, os métodos fenotípicos não são capazes de distinguir as enzimas específicas que são responsáveis pela produção de ESBL (TEM, SHV, CTM-X, OXA, entre outras) (45). Para além disso, os métodos moleculares têm o potencial de serem feitos diretamente da amostra clínica, sem a necessidade de realizar a cultura da bactéria, com a consequente redução do tempo de execução (66).

Assim, a detecção de estirpes produtoras de ESBL em laboratórios clínicos é um passo fundamental para uma gestão adequada dos pacientes, e a identificação genotípica destas enzimas fornece informação providencial para a prevenção de infeções (45).

#### **2.7.3.1. Detecção fenotípica**

Para a identificação inicial de estirpes produtoras de ESBL deve-se utilizar a metodologia proposta pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), que orienta a detecção baseada no princípio de que as ESBL hidrolisam cefalosporinas de terceira e quarta geração, embora sejam inibidas pelo ácido clavulânico (45, 46).



O método quantitativo E-test consiste em tiras de plástico com dois lados, que contêm impregnados antibióticos consoante um gradiente de concentração, sendo que uma das extremidades contém ceftazidima (0,5 a 32 µg/ml) ou cefotaxima (0,25 a 16 µg/ml) e a outra extremidade contém a mesma cefalosporina associada ao ácido clavulânico (0,064 a 4 µg/ml ou 0,016 a 1,0 µg/ml, respetivamente) (42, 52). A bactéria será considerada produtora de ESBL quando a leitura apresentar uma diminuição  $\geq 3$  diluições (ou  $\geq 8$  µg/ml) na concentração mínima inibitória (CMI) da cefalosporina na presença de ácido clavulânico em relação à CMI da cefalosporina sozinha (52, 67). Este método baseia-se no aumento da sensibilidade na presença do ácido clavulânico e é recomendado pelo CLSI para testes confirmatórios de ESBL (64). O aparecimento de uma “zona fantasma”, ou seja, distorção do halo de inibição, confirma a presença de uma ESBL. Este teste apresenta uma sensibilidade entre 87-100% e uma especificidade entre 95-100%, dependendo ambas do rácio das CMIs da cefalosporina versus a combinação da cefalosporina/ácido clavulânico (52).

A identificação de estirpes produtoras de ESBL pode ser feita mediante a visualização de fenómenos de sinergismo (64). O teste consiste num método de difusão em agar utilizando uma placa de Mueller-Hinton inoculada com uma suspensão bacteriana ajustada à concentração 0,5 da escala de MacFarland, seguida da colocação de discos de cefalosporinas de amplo espectro, tais como, ceftazidima (CAZ), ceftriaxona (CRO), cefotaxima (CTX) e aztreonam (ATM), distantes 20-30 mm (centro a centro) de um disco que contenha um inibidor de  $\beta$ -lactamases (amoxicilina/ácido clavulânico – AMC - 20/10µg) (52, 64, 67). Uma extensão clara do limite da zona de inibição do antibiótico  $\beta$ -lactâmico em direção ao disco de amoxicilina/ácido clavulânico é interpretada como sinergia positiva, indicando a presença de ESBL (52). A avaliação de estirpes produtoras de ESBL através deste método revelou taxas de sensibilidade de 79% a 97% e especificidade de 94% a 100% (52). Este método é o mais utilizado na rotina laboratorial, pelo baixo custo, fácil acesso à metodologia e pelo tempo de obtenção dos resultados (64). Contudo, a falta de padronização da distância entre os discos constitui a maior dificuldade neste processo (64).

Outro método fenotípico utilizado para a deteção de estirpes produtoras de ESBL é o teste de adição de ácido clavulânico a discos de ceftazidima (64). Este método baseia-se na comparação do tamanho do halo de inibição em torno dos discos de ceftazidima com o

halo do mesmo antibiótico  $\beta$ -lactâmico associado ao inibidor de  $\beta$ -lactamases, a fim de reconhecer o aumento do halo de inibição na presença desse inibidor (64). Uma diferença igual ou superior a 5 mm entre os diâmetros das zonas de um dos discos da cefalosporina e o disco cefalosporina/inibidor indica a presença de uma bactéria produtora de ESBL (52, 64).

Os sistemas automatizados VITEK<sup>®</sup> (BioMérieux) e MicroScan<sup>®</sup> (Dade Behring) fazem parte de painéis de microdiluição, que incluem testes com  $\beta$ -lactâmicos associados aos inibidores de  $\beta$ -lactamases a fim de detetar a presença de estirpes produtoras de ESBL (52, 64). A análise fenotípica de *Enterobacteriaceae* por este método proporciona uma padronização e rapidez, o que garante uma boa consistência de resultados em comparação com os métodos com discos, que só fornecem resultados após 18-24h (52, 64). Estes dois sistemas automatizados têm apresentado sensibilidade e especificidade maiores que 90% na detecção de estirpes produtoras de ESBL (52, 60). Todavia, estes métodos possuem algumas desvantagens em comparação com a difusão em agar, porque determinadas bactérias crescem lentamente, apresentando pouco crescimento durante as 4-5h de incubação (*Proteus* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp., entre outras) (64).

### 2.7.3.2. Detecção genotípica

O método molecular mais simples e mais utilizado para detectar a presença de um determinado tipo de  $\beta$ -lactamases é a *Polymerase Chain Reaction* (PCR), em que se utilizam *primers* oligonucleotídicos específicos para um determinado gene de  $\beta$ -lactamase (44, 45, 67). Os *primers* podem ser escolhidos usando sequências publicadas no *National Center for Biotechnology Information*, de forma a ocorrer o “*annealing*” com regiões que geralmente não sofrem mutações (44). Este método consiste na amplificação por PCR dos genes usando os *primers*, seguido de sequenciação (45). A sequenciação é essencial para discriminar entre as enzimas que não são ESBL (por exemplo, TEM-1, TEM-2 ou SHV-1) e as diferentes variantes de ESBL do tipo TEM ou SHV (por exemplo, TEM-3 e SHV-2) (45).

Muitos métodos adicionais para detecção e diferenciação sem sequenciamento foram sugeridos, como por exemplo, *Restriction Fragment Length Polymorphism - Polymerase*

*Chain Reaction* (PCR-RFLP) e *Single-Strand Conformational Polymorphism* – *Polymerase Chain Reaction* (PCR-SSCP) (44). Porém, o método padrão continua a ser o sequenciamento da cadeia específica dos nucleotídeos dos genes das  $\beta$ -lactamases (44, 45).

## 2.8. Epidemiologia de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL

Desde o aparecimento das primeiras espécies bacterianas produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido, em 1983 na Alemanha e em 1985 na França, a difusão mundial de organismos que possuem este fenótipo característico teve um sério impacto sobre o controlo clínico de infeções (4, 68, 69). Nos últimos 5 a 10 anos, a incidência de infeções causadas por espécies *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL tem aumentado muito rapidamente, devido principalmente à distribuição bem sucedida de enzimas CTX-M em *Escherichia coli* causadoras de infeções do trato urinário (68). Tem sido relatado cada vez mais a ocorrência de espécies produtoras de ESBL em pessoas não hospitalizadas, o que acentua a existência de importantes reservatórios destes microrganismos fora do ambiente hospitalar (4, 70, 71).

As espécies produtoras de ESBL mais comuns em todo o mundo são a *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, responsáveis por diversas infeções, tais como infeções do trato urinário, infeções intra-abdominais e bacteriemias, tanto no contexto hospitalar como na comunidade (3, 4, 72). No entanto, a incidência de espécies produtoras de ESBL varia consoante a região geográfica (60). As taxas mais altas de espécies isoladas de *Klebsiella pneumoniae* foram descritas no leste da Europa e na América do Sul, onde mais de 50% das amostras isoladas são potenciais produtores de ESBL, o que contrasta com a América do Norte e norte da Europa, onde 12,3% e 16,7% das amostras isoladas, respetivamente, são potenciais produtores de ESBL (3, 73). Tendências similares foram descritas em amostras isoladas de *Escherichia coli*, em que 28,9% e 18,5% das amostras isoladas no leste da Europa e América do Sul, respetivamente, são produtoras de ESBL, em comparação com 7,5% e 6,2% na América do Norte e norte da Europa (3, 73).

Até ao final do século XX as ESBL do tipo TEM e SHV estavam amplamente distribuídas por todo o Mundo, sendo que a maioria dos surtos epidémicos ocorria em

ambientes hospitalares devido a estas  $\beta$ -lactamases clássicas, com elevada prevalência em *Klebsiella pneumoniae* comparativamente à *Escherichia coli* (49). Com o passar dos anos, procedimentos inadequados de controlo de infeções, juntamente com a pressão seletiva exercida pelos antibióticos levaram ao aparecimento de novas  $\beta$ -lactamases, como o caso da CTX-M que é actualmente a mais prevalente a nível mundial, particularmente em *Escherichia coli*, seguida de outras espécies de *Enterobacteriaceae* como *Klebsiella pneumoniae* (49, 52, 68). Estas  $\beta$ -lactamases ocupam uma posição de destaque na incidência e disseminação na Europa e noutros continentes a nível hospitalar e na comunidade (69, 74, 75). Na Irlanda, em 1997, foi isolada uma *Escherichia coli* produtora de ESBL, responsável por uma infeção do trato urinário numa idosa sem antecedentes recentes de hospitalização, mas submetida a um tratamento múltiplo com antibióticos (45, 76). No mesmo período, em França, num estudo sobre a etiologia das ITU, detetaram a presença de cinco estirpes produtoras de ESBL, duas delas provenientes de indivíduos sem história recente de hospitalização (76). Num outro estudo realizado em Espanha em 2002, foi isolada uma *Escherichia coli* produtora de ESBL do tipo CTX-M-14 em urinas de 70 doentes sem um único episódio de admissão hospitalar, demonstrando por análise genética que o gene *bla*<sub>CTX-M-14</sub> poderá ser responsável pela sua alta expressão (76). A partir dos resultados destes estudos, levantou-se a hipótese da aquisição de estirpes produtoras de ESBL adquiridas na comunidade, e outros estudos surgiram com o objetivo de verificar a incidência destas  $\beta$ -lactamases neste nicho particular (45, 76-78).

A identificação de estirpes produtoras de ESBL do tipo CTX-M, relacionadas com infeções do trato urinário na comunidade, surgiu principalmente após o ano 2000 (37, 72, 79). A  $\beta$ -lactamase CTX-M-15, descrita pela primeira vez na Índia em 2001, é actualmente a mais prevalente em todo o Mundo (3, 68, 74, 80). Em Portugal, Espanha, Inglaterra, França, Itália, Áustria, Tunísia, Coreia do Sul e Canadá, registou-se a disseminação de um clone de *Escherichia coli* produtor de CTX-M-15 na comunidade, com consequente passagem para o meio hospitalar (3, 68, 69, 81, 82).

Epidemiologicamente, a incidência atual de bactérias produtoras de ESBL apresenta variações geográficas e temporais, sendo Portugal um dos países da Europa com maior incidência destas estirpes (69). A utilização excessiva de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, quinolonas, aminoglicosídeos e glicopéptidos na indústria agrícola, pecuária e na aquacultura, seja para fins terapêuticos ou profiláticos, contribuiu para o aparecimento de

$\beta$ -lactamases em animais e no meio ambiente (83). Os animais constituem importantes reservatórios de genes de resistência, particularmente de ESBL, contribuindo para a entrada e disseminação destes determinantes genéticos na cadeia alimentar e no meio ambiente (52, 83).

Desde o aparecimento de infecções do trato urinário provocadas por espécies produtoras de ESBL na comunidade, uma questão tem sido colocada: os médicos devem prescrever agentes antimicrobianos com um espectro mais amplo para tratar os pacientes que vêm da comunidade? Uma das principais preocupações desta prática clínica é que o uso prolongado destes agentes de amplo espectro pode contribuir para a disseminação da resistência antibacteriana (4, 68). Na literatura estão relatados os vários factores de risco para infecções provocadas por estirpes produtoras de ESBL na comunidade, sendo os principais: idade avançada, anomalia no trato urinário, uso de cateter numa hospitalização anterior ou recente exposição a múltiplos agentes antimicrobianos (4, 68).

### **III. OBJETIVOS**

---



Considerando o impacto das  $\beta$ -lactamases de espectro estendido na resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, e tendo por base a crescente necessidade em obter resultados ao nível da clínica hospitalar que levem a tratamentos mais direcionados e específicos, esta tese tem por base três objetivos essenciais:

- I. Recolha de dados demográficos para a criação de uma base de dados relativa a infeções do trato urinário da população servida pelo Centro Hospitalar do Baixo Vouga, EPE - Aveiro;
- II. Averiguar quais os principais agentes causadores de infeções do trato urinário, na população servida pelo Centro Hospitalar do Baixo Vouga, EPE - Aveiro;
- III. Inferir sobre a disseminação de ESBL em isolados causadores de infeções do trato urinário.





## **IV. MATERIAL E MÉTODOS**

---



#### **4.1. Caracterização do Hospital Infante D. Pedro, EPE**

O presente estudo foi realizado no serviço de Patologia Clínica, na secção de microbiologia, do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, EPE – Hospital Infante D. Pedro. (HIP). O HIP apresenta várias valências de internamento: medicina interna, cirurgia geral, ortopedia, pediatria e obstetrícia/ginecologia. O serviço de urgência deste hospital é um serviço de urgência médico-cirúrgica, englobando também outras especialidades, nomeadamente a de Patologia Clínica.

O serviço de Patologia Clínica é composto pelos seguintes setores: hematologia e coagulação, bioquímica geral, imunoquímica (inclui hormonologia, alergologia e autoimunidade) e microbiologia geral (inclui micobacteriologia, serologia e biologia molecular). Funciona 24 horas por dia e dá apoio ao internamento, consulta externa, bloco operatório, cirurgia de ambulatório, hospital de dia e serviço de urgência.

No laboratório de microbiologia do HIP são realizados exames que contribuem para o diagnóstico, tratamento, monitorização e prevenção de doenças. O recurso à microbiologia é extremamente importante no diagnóstico clínico, pois, é através dela que é possível detetar qual o microrganismo causador da infeção e qual a sua susceptibilidade aos antimicrobianos. Contudo, para que se possam ter resultados fiáveis, é necessário que a colheita dos produtos biológicos seja efetuada corretamente. Amostras de urina, expetoração e sangue estão entre os principais produtos biológicos enviados para análise microbiológica. O laboratório é composto por um quadro de pessoal multidisciplinar do qual fazem parte, patologistas clínicos, técnicos superiores de saúde, técnicos de análises clínicas e assistentes técnicos.

Foram recolhidos os dados demográficos dos pacientes que deram entrada no HIP, durante o período de estudo, entre Janeiro e Dezembro de 2012, com pedido de exame bacteriológico de urina. Os dados recolhidos permitiram criar uma base de dados relativa a infeções do trato urinário de pacientes do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, EPE. A base de dados criada inclui os diversos campos: número de amostra, número de exame, data do pedido, número de processo, nome do paciente, sexo, idade, serviço requisitante, tipo de amostra, microrganismo, produção de ESBL e multirresistência. Esta base possui, ainda, informação relativa ao internamento do paciente, dados estes a cargo da Comissão de Controlo de Infeção do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, EPE–Hospital Infante D.Pedro.

## 4.2. Amostra

No presente estudo foram incluídos microrganismos isolados a partir de amostras de urina, que deram entrada no serviço de Patologia Clínica/microbiologia do HIP entre Janeiro e Dezembro de 2012, de acordo com os seguintes critérios: urina colhida de um paciente com idade igual ou superior a 65 anos, com um diagnóstico primário de ITU, sendo a amostra colhida apenas no serviço de urgência. Não foram incluídos os duplicados.

A identificação da espécie bacteriana e o perfil de susceptibilidade aos antibióticos foi realizada por um sistema de detecção automático, o VITEK<sup>®</sup> 2 (configurado de acordo com a *guideline* do “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” - CLSI) e pelo *software* VITEK<sup>®</sup> 2 AES (*Advanced Expert System*) (BioMérieux, Marcy L’Étoile, França). Foram utilizadas cartas de identificação para microrganismos Gram-negativos (GNI) (ANEXO II) e para o estudo da susceptibilidade aos antimicrobianos foram utilizadas as cartas AST-N192 (ANEXO III) e AST-N222 (ANEXO IV). As espécies *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* foram investigadas para detetar a presença de ESBL. As estirpes bacterianas produtoras de ESBL foram confirmadas pelo método E-test (AB BioMérieux) com tiras de Cefotaxima/Cefotaxima+Ácido Clavulânico e Ceftazidima/Ceftazidima+Ácido Clavulânico, de acordo com as instruções do fabricante.

Durante o período de estudo, o laboratório de microbiologia recebeu 7731 requisições de exames bacteriológicos de urinas, das quais 424 amostras foram incluídas neste estudo de acordo com os critérios de seleção referidos anteriormente.

### 4.2.1. Identificação das espécies bacterianas

Após a receção no laboratório, as amostras foram semeadas em meios de cultura selecionados de acordo com as normas do serviço de microbiologia, e incubadas durante 24h a 35°C. A identificação bacteriana dos isolados foi efetuada com recurso às características morfológicas das colónias, a coloração de Gram (ANEXO V), e a carta de identificação VITEK<sup>®</sup> 2 de Gram-negativo. A identificação das bactérias inicia-se com a coloração de Gram, uma vez que esta permite a diferenciação das bactérias quanto à forma, em cocos ou bacilos, e quanto à coloração, em bactérias Gram-negativas ou Gram-

positivas. A utilização e escolha de um tipo de carta de identificação foi realizada de acordo com o resultado da coloração de Gram executada previamente. Para efetuar uma urocultura o meio de cultura a utilizar é o agar CLED (*Cystine Lactose Eletrolyte Deficient*) que permite o cultivo de microrganismos aeróbios ou microaerofílicos, é um meio específico para as urinas e contém cisteína. O agar CLED é apenas diferencial, permitindo uma boa diferenciação entre as colónias. Este agar permite saber se a bactéria é fermentadora da lactose, sendo que as colónias de cor amarela são lactose positiva e as colónias de cor azul são lactose negativa. Este meio apresenta um défice de eletrólitos e permite limitar a proliferação de espécies de *Proteus*. Devido a uma ampla disponibilidade de substâncias nutritivas e por não possuir substâncias inibidoras, é considerado o meio de cultura universal para uroculturas.

Os equipamentos da gama VITEK-BioMérieux são sistemas completamente automatizados que permitem a identificação e a determinação da sensibilidade aos antibióticos, através da inoculação e incubação de cartas de identificação, criadas para o efeito. A carta de identificação de Gram-negativos (GNI) destina-se a ser utilizada com o sistema VITEK® para a identificação automática de microrganismos da família *Enterobacteriaceae*. Além disso, a carta tem capacidade para identificar um grupo selecionado de bactérias Gram-negativas não fermentadoras de glucose. Esta carta possui vários poços que contêm agentes bioquímicos e um poço que contém um agente de controlo de crescimento. A identificação necessita, normalmente, de 18h a 24h de incubação no Leitor/Incubador VITEK®.

O critério de positividade foi a contagem de unidades formadoras de colónias por mililitro de urina (UFC/ml), associada ao exame direto fresco, sendo considerada bacteriúria significativa quando a contagem é igual ou superior a  $10^5$  UFC/ml (tabela 7).

**Tabela 7** – Avaliação do crescimento bacteriano em CLED (*adaptado de (13,14)*)

Número de Colónias	UFC/ml de urina	Avaliação
<10	$<10^3$	Bacteriúria Não Significativa
10-100	$\geq 10^4$ e $\leq 10^5$	Duvidosa
>100	$\geq 10^5$	Bacteriúria Significativa

#### 4.2.2. Avaliação da susceptibilidade aos antibióticos

O teste de sensibilidade aos antibióticos (TSA) é indicado para todos os microrganismos que contribuam para um processo infeccioso e que justifique uma terapia antimicrobiana. As colónias bacterianas são isoladas em placas de gelose e testadas quanto à sensibilidade aos antibióticos. Este teste baseia-se na determinação das CMI<sub>s</sub>, em que se usam concentrações de antibióticos derivadas de diluições duplas sucessivas, sendo por isso determinado a partir da concentração mais baixa em que ocorre inibição do crescimento bacteriano. O TSA foi realizado com o auxílio do equipamento VITEK<sup>®</sup>2 (figura 3) (84).



**Figura 3** – Diferentes etapas do método automático VITEK<sup>®</sup>2 (*adaptado de (83)*)

As cartas utilizadas neste equipamento para a avaliação da susceptibilidade aos antibióticos são constituídas por porções liofilizadas, pré-medidas e pesadas individualmente, de um agente antimicrobiano específico e combinado com meios de cultura microbiológicos. Em todas as cartas existe um poço de controlo, que contém apenas meio de cultura microbiológico. O inóculo realizado previamente para a identificação do microrganismo é suficiente para efetuar o antibiograma, e a suspensão deverá apresentar uma densidade equivalente a um padrão entre 0,5 e 0,65 na escala de

MacFarland para bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, e entre 1,80 e 2,20 para fungos. Após a identificação do microrganismo como Gram-negativo ou Gram-positivo, são selecionadas as respectivas cartas de susceptibilidade. Neste trabalho foram utilizadas as cartas AST-N192 (ANEXO III) e AST-N222 (ANEXO IV) para microrganismos Gram-negativos. Cada carta AST apresenta 64 micropoços com antibióticos selecionados e em concentrações variadas. O aparelho monitoriza o crescimento em cada um dos poços da carta durante um período de tempo definido (até 18 horas para bactérias). O sistema determina qual o poço que apresenta crescimento do microrganismo com base na diminuição da intensidade de luz que é medida pelo leitor ótico. No fim do ciclo de incubação, um resultado interpretativo (Sensível, Intermédio ou Resistente) relativamente ao agente antimicrobiano será assinalado juntamente com uma CMI, de acordo com as interpretações definidas pelo CLSI.

#### **4.2.3. Teste VITEK<sup>®</sup> 2 ESBL**

O teste VITEK<sup>®</sup> 2 ESBL (BioMerieux, Marcy-L'Etoile, França) faz parte de uma das cartas de susceptibilidade aos antibióticos para Gram-negativos, a AST-N192 (ANEXO III). As estirpes em estudo foram submetidas a este método semi-automático de diluição em caldo seguindo os procedimentos do fabricante. O teste ESBL é constituído pelos seguintes antibióticos: cefepima (1 µg/ml), cefotaxima (0,5µg/ml), ceftazidima (0,5 µg/ml) e pela associação destas cefalosporinas com o ácido clavulânico, com as respectivas concentrações de 1/10 µg/ml, 0,5/4 µg/ml e 0,5/4 µg/ml. A suspensão de microrganismo a ser testada foi diluída numa concentração padronizada em 0,45% de solução salina antes de ser utilizada para re-hidratar o meio antibiótico na carta. A carta foi em seguida, cheia, selada e colocada no leitor/incubadora do aparelho manualmente. Da mesma forma, o aparelho monitoriza o crescimento em cada um dos poços da carta durante um período de tempo definido. No fim do ciclo de incubação, os resultados do teste, são determinados para cada antibiótico contido na carta.

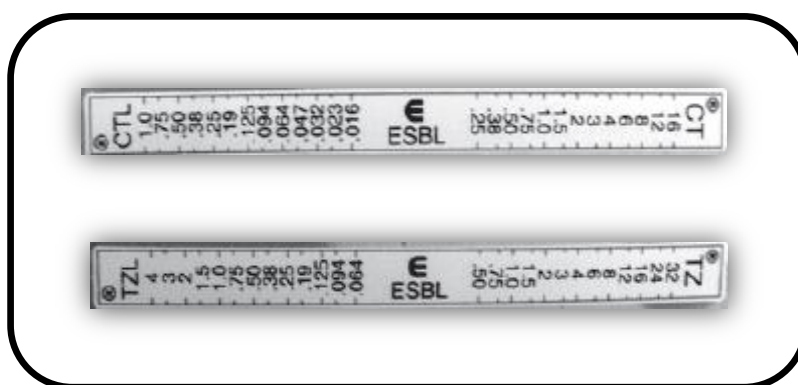
Os resultados foram considerados positivos quando foi detetada uma redução proporcional de crescimento nos poços contendo cefalosporinas associadas ao ácido clavulânico em comparação com aqueles que continham apenas a cefalosporina sozinha.



#### 4.2.4. Método quantitativo E-test

O método E-test foi utilizado como teste confirmatório de estirpes produtoras de ESBL. As suspensões bacterianas foram inoculadas em placas de Petri com gelose de Mueller–Hinton, semeadas com zaragatoa em três planos diferentes. As tiras E-test (AB BioMérieux) usadas contêm uma combinação de Cefotaxima/Cefotaxima+Ácido Clavulânico (CT/CTL) ou Ceftazidima/Ceftazidima+Ácido Clavulânico (TZ/TZL) (figura 4). Estas tiras apresentam um gradiente de concentração decrescente das cefalosporinas sozinhas numa das extremidades e na outra extremidade um gradiente de concentração decrescente da cefalosporina associada ao ácido clavulânico. As tiras E-test foram aplicadas com uma pinça, na superfície do meio inoculado, e posicionadas lado a lado, invertidas, sendo as placas incubadas a 35°-37°C durante 18-24 horas.

O resultado foi considerado positivo quando a razão entre o valor obtido para a cefalosporina e a cefalosporina associada ao ácido clavulânico for superior a 8. Caso o resultado seja inferior a 8, é considerado negativo. O resultado é considerado indeterminável, quando não é possível estabelecer uma CMI quer para a cefalosporina sozinha quer para a sua associação ao ácido clavulânico.



**Figura 4** – Tiras E-test® ESBL – CT/CTL e TZ/TZL (adaptado de (83))

Foram testadas duas estirpes de referência ATCC (*American Type Culture Collection*) como controlo de qualidade. Uma *Escherichia coli* ATCC 25922 (ESBL Negativa) e uma *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (ESBL Positiva). Os resultados dos

testes só foram aceites quando o resultado do controlo de qualidade se encontrava entre os limites aceitáveis, de acordo com os critérios do CLSI.

### **4.3. Tratamento estatístico**

Os resultados foram analisados recorrendo ao programa informático *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS - versão 21.0 para Windows, Inc. Chicago, IL, USA). Foi utilizada na análise dos resultados estatística descritiva simples, nomeadamente media, desvio padrão e frequências. Em valores qualitativos utilizou-se o teste de Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ) para determinar diferenças entre proporções. O nível de significância considerada foi de  $p < 0.05$ . Foram ainda utilizados, um *software* de gestão de dados e estatística em plataforma Windows XP que permite a monitorização de dados múltiplos provenientes do sistema automático de microbiologia VITEK<sup>®</sup>2 *Advanced Expert System* (BioMerieux, Marcy L'Etoile, França) e o sistema informático *Appolo*, sistema de gestão laboratorial do serviço de Patologia Clínica, facilitando a consulta de histórico de dados microbiológicos, a realização de estatísticas diversas e a gestão de doentes e requisições.



## **V. RESULTADOS**

---

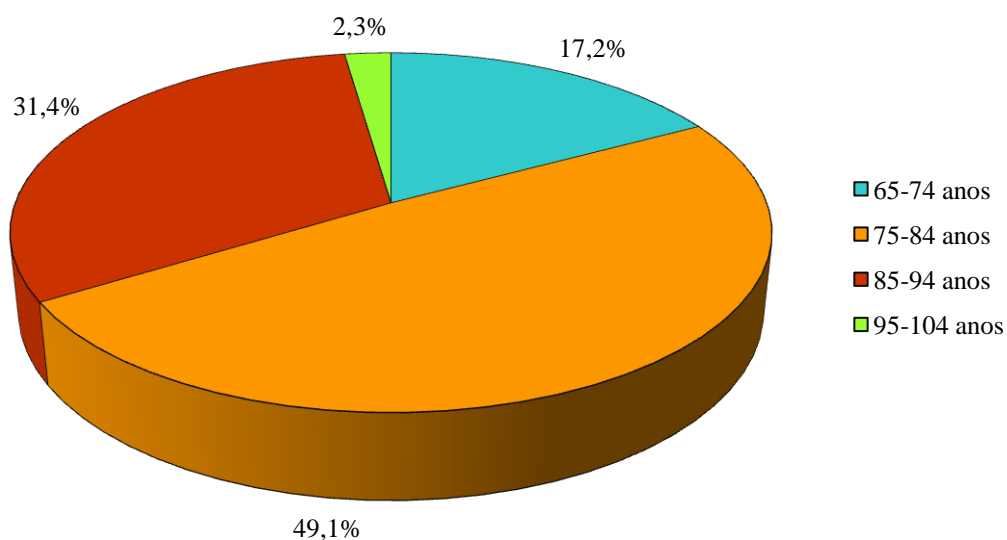


A recolha de dados demográficos permitiu criar uma base de dados relativa a infeções do trato urinário da população servida pelo Centro Hospitalar do Baixo Vouga, EPE. Nessa base estão incluídos os dados demográficos dos pacientes de todos os pedidos de exames bacteriológicos de urinas que foram realizados durante o período de estudo, permitindo assim a monitorização personalizada de cada doente (ANEXO VI).

### 5.1. Caracterização da população em estudo

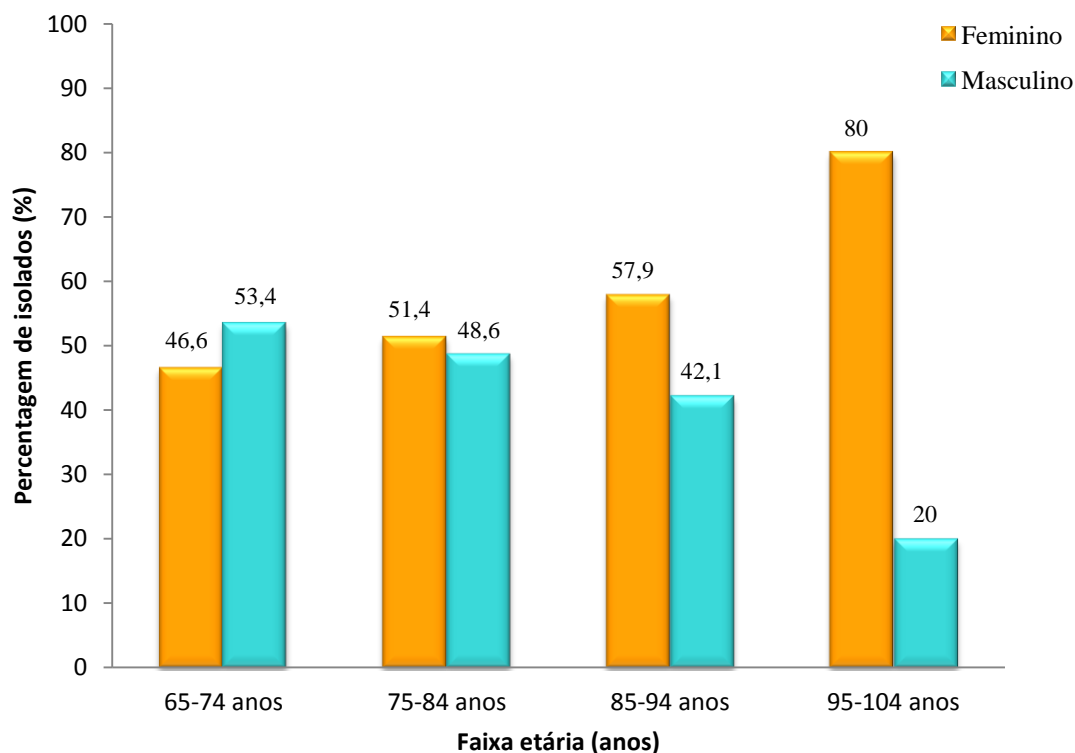
Os dados apresentados referem-se a um estudo cuja recolha das amostras foi realizada entre Janeiro e Dezembro de 2012 no laboratório de microbiologia do Hospital Infante D. Pedro, EPE. Foram estudadas 424 amostras obedecendo a três critérios: amostras de urina de pacientes com idade igual ou superior a 65 anos, com um diagnóstico primário de ITU e provenientes apenas do serviço de urgência.

Ao analisar a distribuição dos doentes estudados, observa-se que 53% são do género feminino enquanto 47% são do género masculino. A distribuição das idades dos pacientes revela que 17,2% apresentam idades compreendidas entre 65 e 74 anos, 49,1% idades entre 75 e 84 anos, 31,4% dos pacientes têm idades entre 85 e 94 anos e, por fim, 2,3% apresentam idades entre 95 e 104 anos (figura 5). No que diz respeito à tendência central e dispersão, a média de idades foi de  $81,5 \pm 7,1$  (desvio padrão).



**Figura 5** – Distribuição geral dos pacientes estudados por faixa etária

Em termos da distribuição dos pacientes por género e faixa etária, os dados revelam que à excepção do primeiro intervalo de idades (65 aos 74 anos) em que existe uma maior percentagem de isolados obtidos de pacientes do género masculino (53,4%), nos restantes intervalos de idades existe um predomínio de isolados obtidos de pacientes do género feminino (figura 6). Isto é, no intervalo dos 65 aos 74 anos foram obtidos 46,6% de isolados de pacientes do género feminino, dos 75 aos 84 anos obtivemos 51,4%, dos 85 aos 94 anos obtiveram-se 57,9% e dos 95 aos 104 anos foi obtida a maior percentagem de isolados de pacientes do género feminino (80%) em relação aos isolados de pacientes do género masculino (20%) (figura 6).

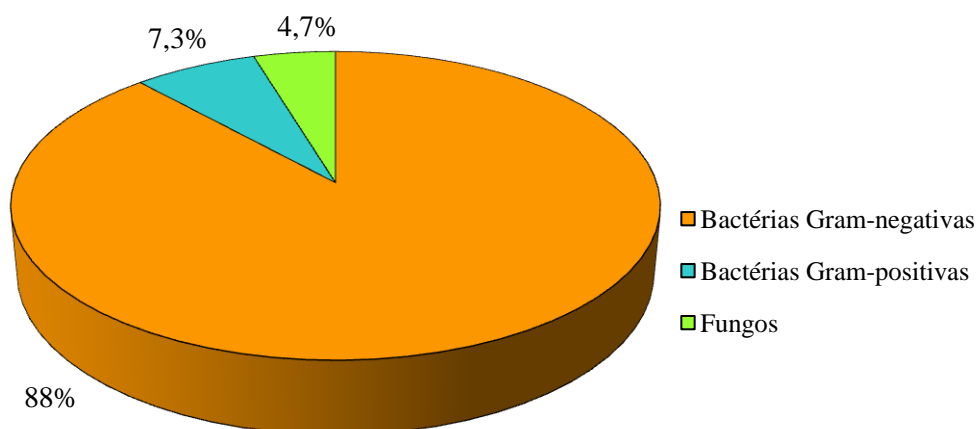


**Figura 6** – Distribuição dos pacientes estudados por género e faixa etária

Contudo, não foram encontradas diferenças significativas em termos de idades, entre os indivíduos do género feminino e masculino.

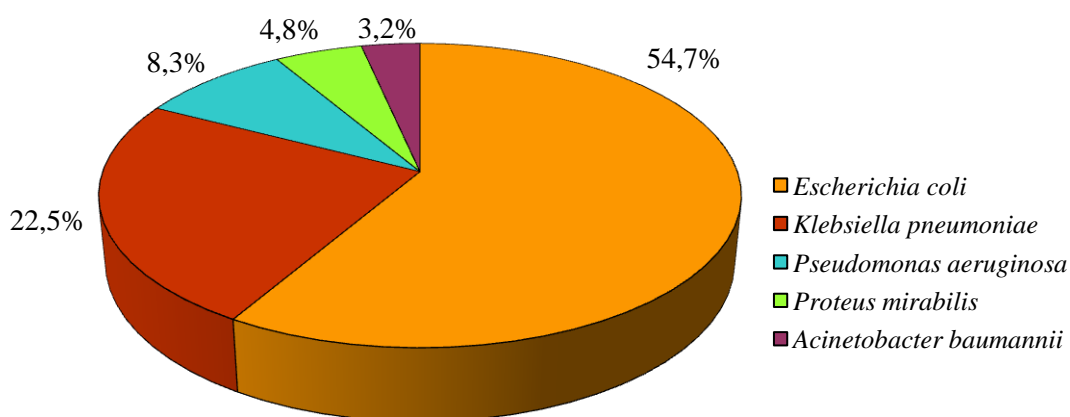
## 5.2. Caracterização dos isolados clínicos

Os isolados estudados provieram apenas de um único produto biológico, urina. Em termos globais, foram isolados 424 microrganismos, dos quais 373 (88%) foram bactérias Gram-negativas, 31 (7,3%) bactérias Gram-positivas e 20 (4,7%) fungos (figura 7).



**Figura 7** – Incidência dos isolados clínicos em termos globais

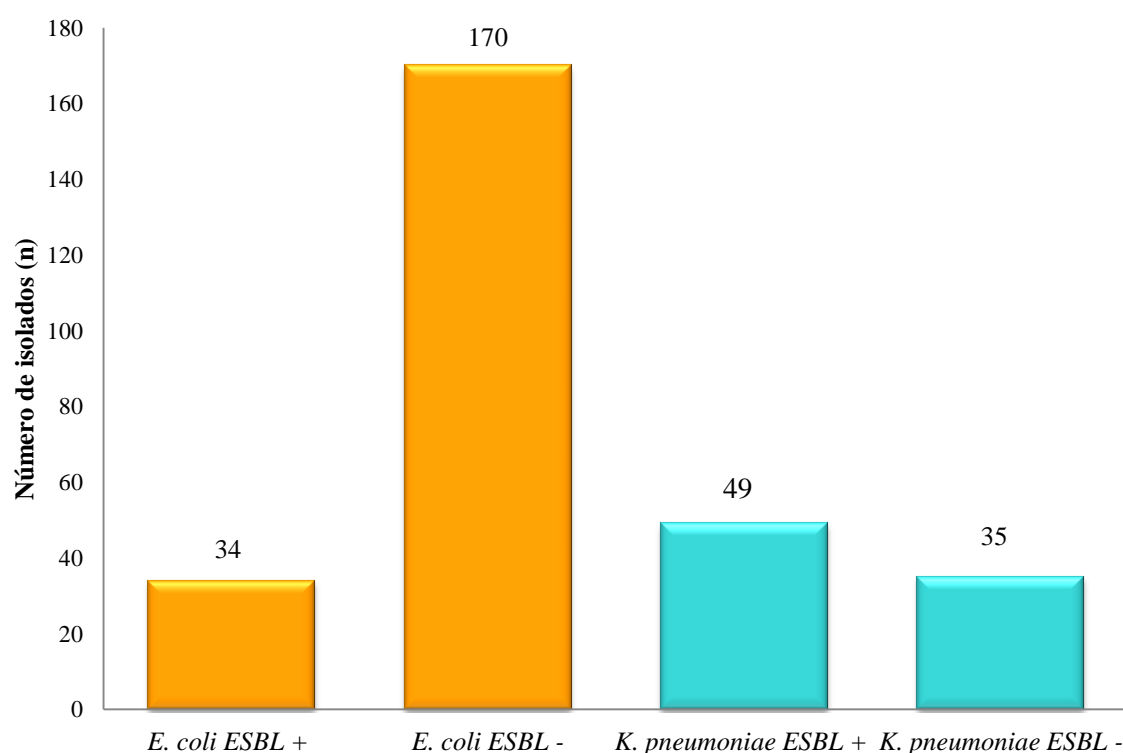
As amostras de urina estudadas revelaram uma grande diversidade de microrganismos, sendo a maioria espécies da família *Enterobacteriaceae* (n=330). Englobando as bactérias Gram-negativas, os microrganismos mais prevalentes foram a *Escherichia coli* (n=204; 54,7%), *Klebsiella pneumoniae* (n=84; 22,5%), *Pseudomonas aeruginosa* (n=31; 8,3%), *Proteus mirabilis* (n=18; 4,8%) e *Acinetobacter baumannii* (n=12; 3,2%) (figura 8).



**Figura 8** – Prevalência das principais bactérias Gram-negativas



A determinação de estirpes produtoras de ESBL foi realizada através do teste VITEK®2 ESBL, e confirmados com tiras E-test, não tendo sido verificadas discrepâncias significativas entre os dois métodos. Assim, foram apenas analisados os resultados referentes ao método automático. Em particular, foram testados os isolados clínicos cuja identificação foi *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (n=288), dos quais 28,8% (n=83) foram classificados como produtores de ESBL. Sendo 17% (n=49) isolados de *Klebsiella pneumoniae* e 11,8% (n=34) de *Escherichia coli* (figura 9).



**Figura 9** – Incidência dos isolados produtores de ESBL

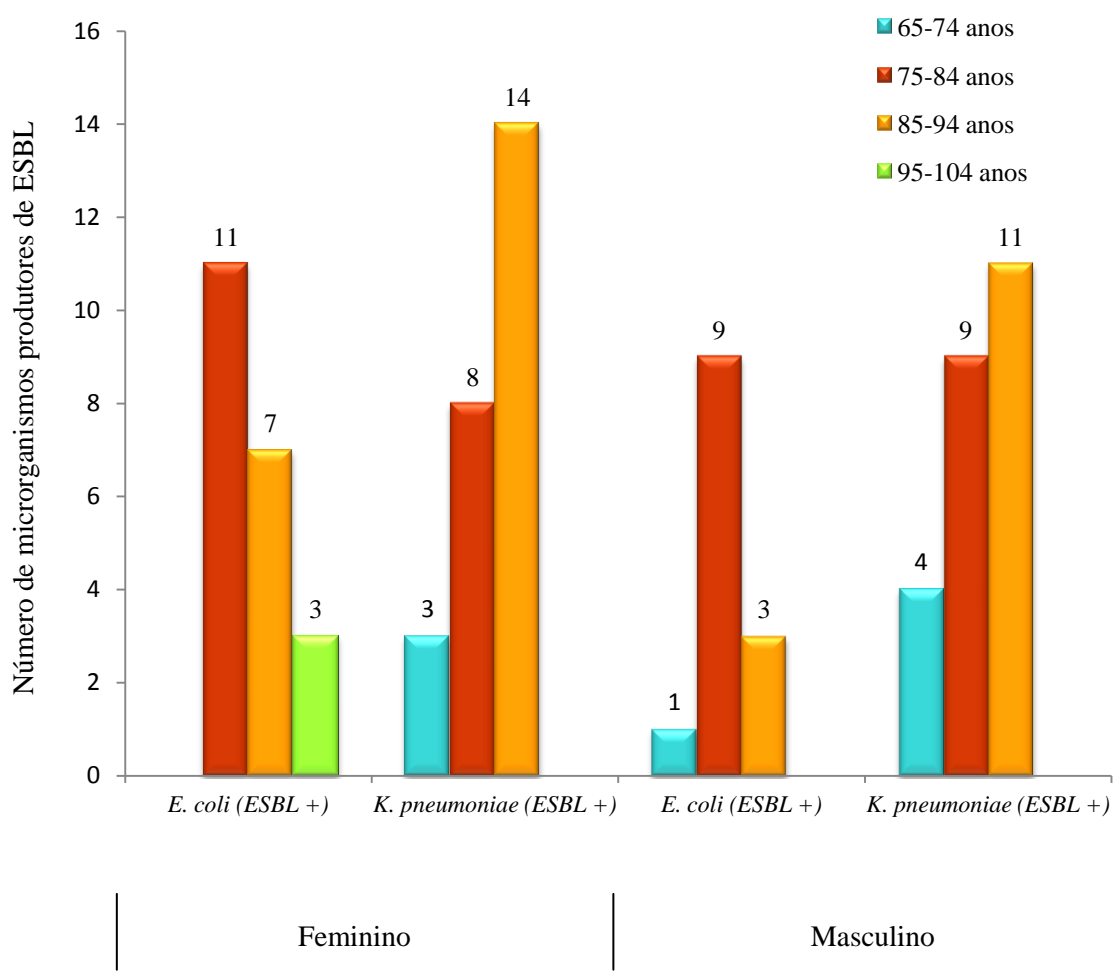
A produção de ESBL em *Klebsiella pneumoniae* corresponde a 58,3% da totalidade dos isolados identificados como *Klebsiella pneumoniae* (n=84), e em *Escherichia coli* a produção de ESBL corresponde a 16,7% da totalidade destes isolados (n=204) (tabela 8). A diferença encontrada entre produtores de ESBL foi estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) na prevalência entre os isolados de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*.

**Tabela 8** – Distribuição dos microrganismos isolados em função do resultado do teste ESBL

Microrganismo	ESBL positivo		ESBL negativo		n Total
	n	%	n	%	
<i>Escherichia coli</i>	34	16,7	170	83,3	204
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	49	58,3	35	41,7	84
<b>Total</b>	83	28,8	205	71,1	288

Como já foi referido anteriormente, analisando a distribuição da totalidade dos isolados estudados, observamos que 53% pertencem a pacientes do género feminino, enquanto 47% pertencem a pacientes do género masculino. Por outro lado, ao nível das estirpes produtoras de ESBL (n=83), encontraram-se 55% (n=46) no género feminino e 45% (n=37) no género masculino. Deste modo, não foram encontradas diferenças significativas em termos de prevalência dos isolados produtores de ESBL de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, entre os indivíduos do género masculino e feminino.

Quanto à incidência dos microrganismos produtores destas  $\beta$ -lactamases por faixa etária, com o aumento da idade os isolados de *Klebsiella pneumoniae* ESBL positivos apresentaram uma incidência crescente em ambos os géneros (figura 10). Quanto aos isolados de *Escherichia coli* ESBL positivos, verificou-se uma maior incidência nos pacientes com idades compreendidas entre os 75 e 84 anos (figura 10).



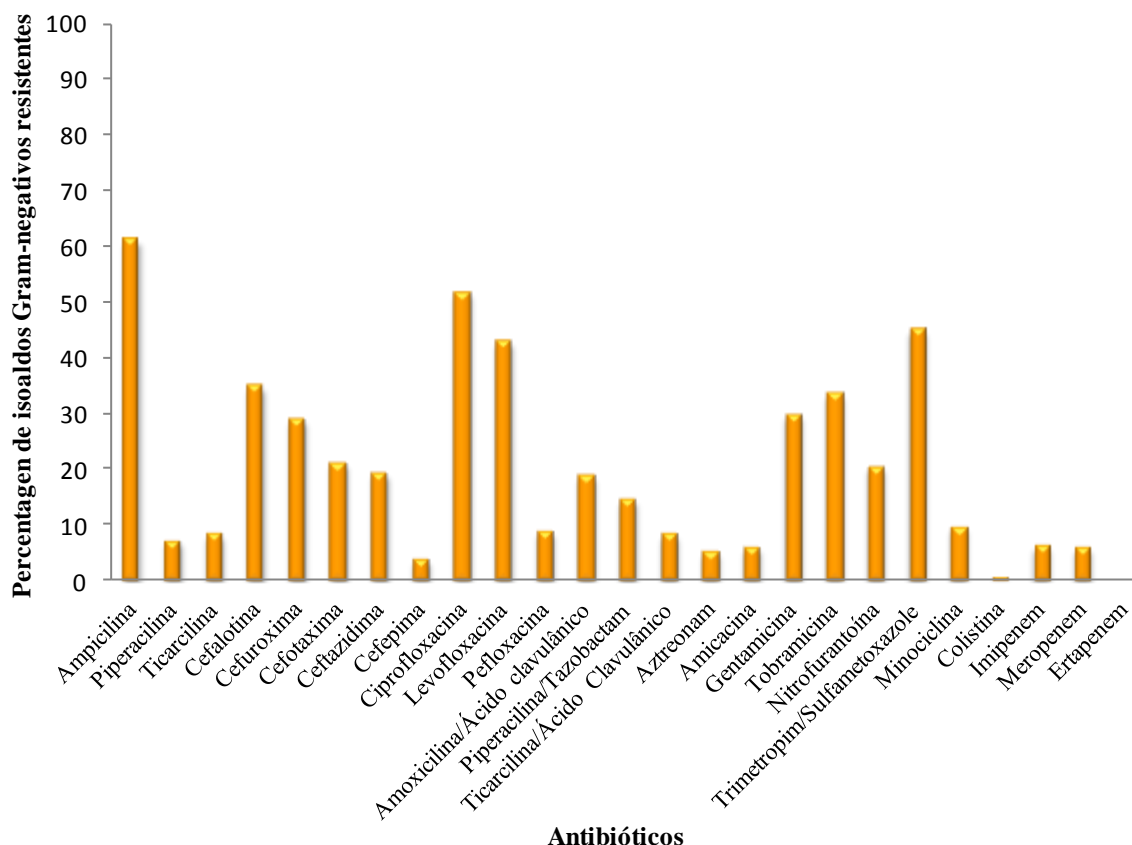
**Figura 10** – Número de microrganismos produtores de ESBL por gênero e faixa etária

Em termos globais, verificou-se uma maior incidência da presença de microrganismos produtores de ESBL em pacientes com idades compreendidas entre os 75 e 94 anos, em ambas as estirpes e em ambos os gêneros (figura 10).

### 5.3. Perfis de resistência aos antibióticos

Os antibiogramas realizados após a identificação dos isolados clínicos causadores de infeções, testam uma vasta gama de antibióticos consoante o microrganismo seja considerado Gram-negativo ou Gram-positivo. As classes de antibióticos às quais os

microrganismos Gram-negativos (n=373) se mostraram mais resistentes foram aos  $\beta$ -lactâmicos (61,1% ampicilina, 34,9% cefalotina, 29,0% cefuroxima e 21,2% cefotaxima), às quinolonas (51,7% ciprofloxacina e 42,9% levofloxacina), a alguns aminoglicosídeos (29,8% gentamicina e 33,5% tobramicina), à nitrofurantoína (20,4%) e ao trimetoprim/sulfametoxazole (45%) (figura 11).

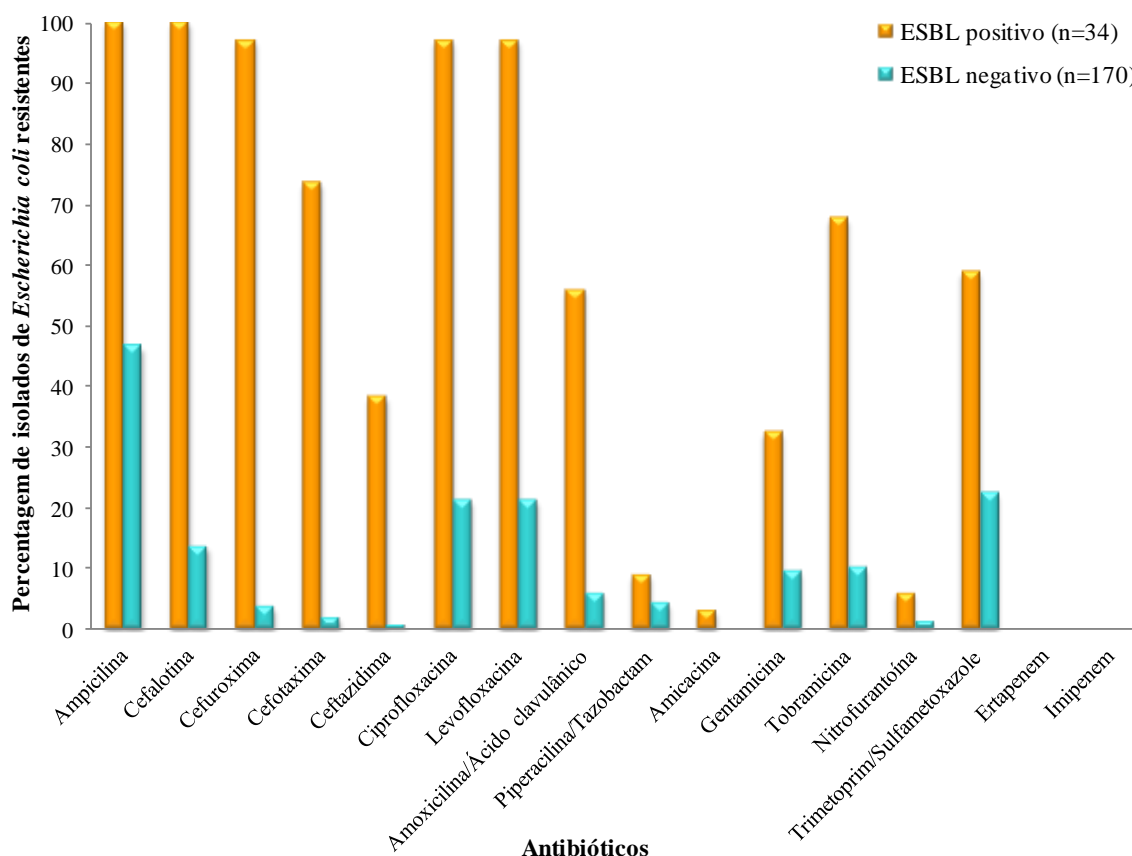


**Figura 11** – Perfil de resistência dos microrganismos Gram-negativos às diferentes classes de antibióticos testados

Os antibióticos contra os quais foram expressas menores taxas de resistência entre os isolados Gram-negativos foram: a colistina (2 isolados; 0,5%), a cefepima (14 isolados; 3,8%), o aztreonam (19 isolados; 5,1%), a amicacina (22 isolados; 5,9%), o meropenem (22 isolados; 5,9 %), o imipenem (23 isolados; 6,2%), a piperacilina (27 isolados; 7,2%). Todos os microrganismos Gram-negativos estudados apresentaram 100% de susceptibilidade ao ertapenem (figura 11).

Analisando as percentagens de resistência aos antibióticos nos isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBL (n=34), verificou-se 100% de resistência à ampicilina

e cefalotina, 97,1% à cefuroxima, ciprofloxacina e levofloxacina, 73,5% à cefotaxima, 67,6% à tobramicina, 58,8% ao trimetoprim/sulfametoxazole, 55,9% à amoxicilina/ácido clavulânico, 38,2% à ceftazidima e 32,4% à gentamicina (figura 12).

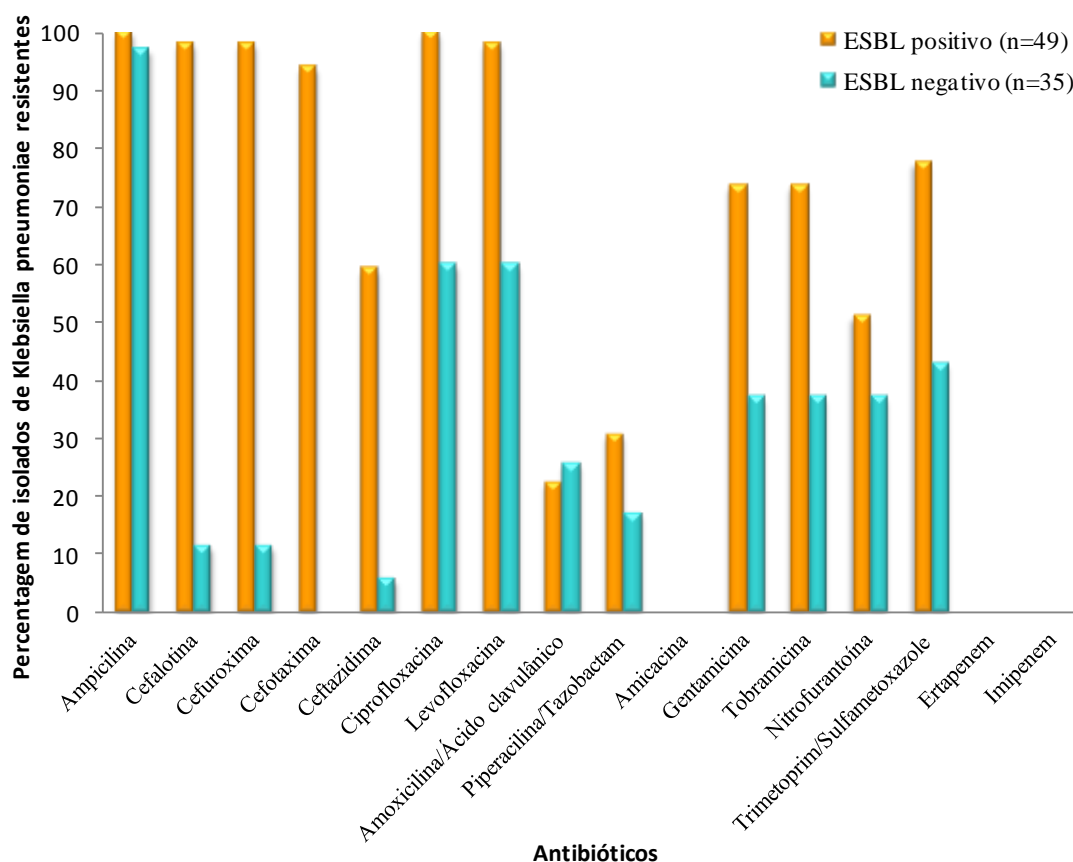


**Figura 12** – Perfil de resistência dos isolados de *Escherichia coli* em relação aos antibióticos testados

As menores percentagens de resistência dos isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBL foram encontradas na presença de antibióticos como a amicacina (1 isolado; 2,9%), nitrofurantoína (2 isolados; 5,9%) e na associação piperacilina/tazobactam (3 isolados; 8,8%) (figura 12). Quanto aos isolados de *Escherichia coli* classificados como não produtores de ESBL (n=170), 46,5% destes isolados apresentaram resistência à ampicilina, 24,4% ao trimetoprim/sulfametoxazole e 21,2% à ciprofloxacina e levofloxacina. Os antibióticos contra os quais foram expressas as menores percentagens de resistência foram a ceftazidima (1 isolado; 0,6%), a nitrofurantoína (2 isolados; 1,2%), a cefotaxima (3 isolados; 1,8%), a cefuroxima (6 isolados; 3,5%), a piperacilina/tazobactam

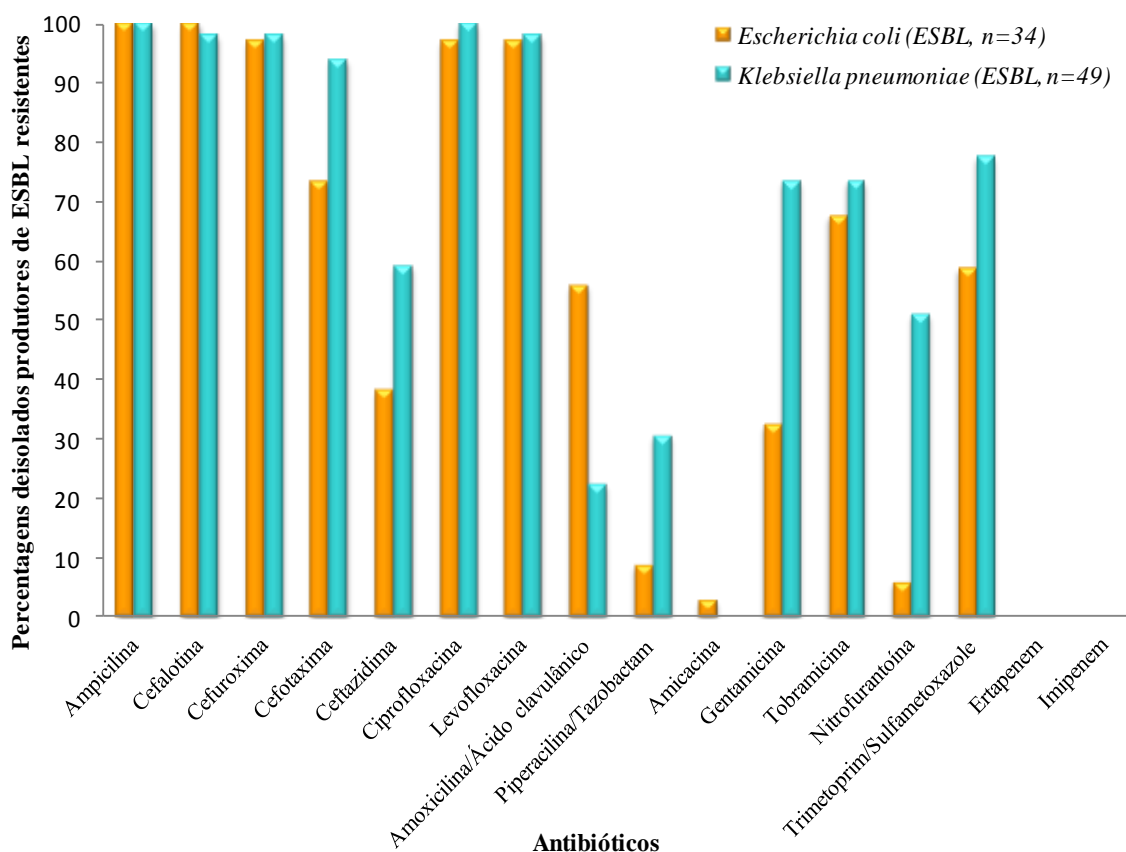
(7 isolados; 4,1%), a amoxicilina/ácido clavulânico (10 isolados; 5,9%), a gentamicina (16 isolados; 9,4%), tobramicina (17 isolados; 10%) e por fim a cefalotina (23 isolados; 13,5%) (figura 12). Contudo, estes isolados de *Escherichia coli* não produtores de ESBL apresentaram taxas de resistência inferiores em todos os antibióticos, comparativamente aos isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBL. Do total dos microrganismos identificados como *Escherichia coli* não produtores de ESBL (n=170), 47,1% (n=80) destes não apresentaram qualquer resistência aos antibióticos testados. É de salientar, que ambas as linhagens de *Escherichia coli* (produtores de ESBL e não produtores) apresentaram 100% de susceptibilidade aos carbapenemos (figura 12).

Por outro lado, os isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBL (n=49) apresentam elevadas percentagens de resistência aos seguintes antibióticos: ampicilina (100%), ciprofloxacina (100%), cefalotina (98%), cefuroxima (98%), levofloxacina (98%), cefotaxima (93,9%), trimetoprim/sulfametoxazole (77,6%), tobramicina (73,5%), gentamicina (73,5%), ceftazidima (59,2%), e nitrofurantoína (51%) (figura 13).



**Figura 13** – Perfil de resistência dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* em relação aos antibióticos testados

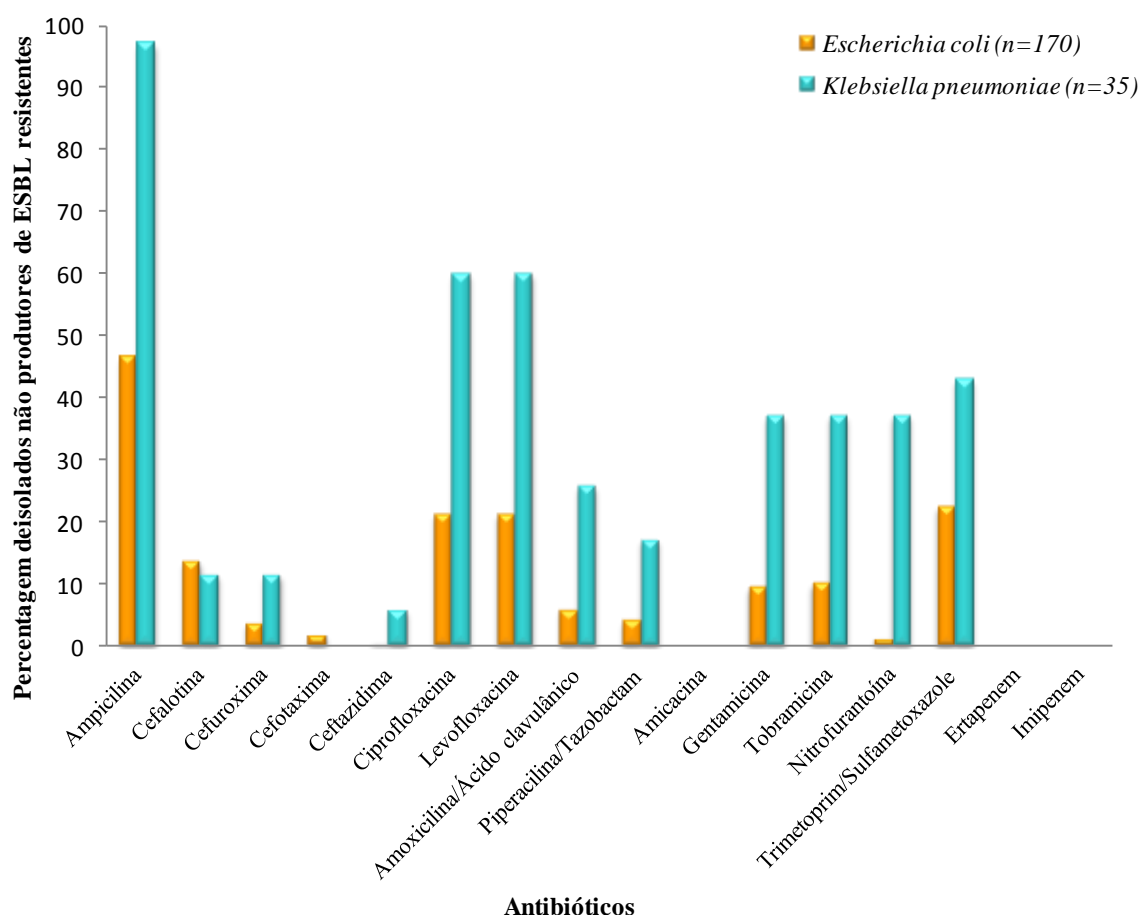
A associação amoxicilina/ácido clavulânico (22,4%) e piperacilina/tazobactam (30,6%) foram os antibióticos aos quais os isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBL apresentaram taxas de resistência mais baixas (figura 13). Quanto aos isolados de *Klebsiella pneumoniae* considerados não produtores de ESBL (n=35), apresentaram percentagens de resistência inferiores em todos os antibióticos, com excepção da amoxicilina/ácido clavulânico, comparativamente aos isolados desta espécie produtores de ESBL. No entanto, 97,1% das *Klebsiella pneumoniae* não produtoras de ESBL apresentaram resistência à ampicilina. As quinolonas (ciprofloxacina e levofloxacina) foram os antibióticos aos quais as *Klebsiella pneumoniae* não produtoras de ESBL apresentaram percentagens de resistência maiores (60%). Quanto às menores resistências, foram observadas na presença dos antibióticos ceftazidima (2 isolados; 5,7%), cefalotina e cefuroxima (ambas com 4 isolados; 11,4%) (figura 13). É de salientar, que ambas as linhagens de *Klebsiella pneumoniae* (produtores de ESBL e não produtores) apresentaram 100% de susceptibilidade aos antibióticos amicacina e aos carbapenemos.



**Figura 14** – Perfil de resistência dos isolados produtores de ESBL

Analisando os perfis de resistência de todos os isolados produtores de ESBL, verificamos que os isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores destas  $\beta$ -lactamases apresentam percentagens de resistência superiores às dos isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBL em 10 dos antibióticos testados (cefuroxima, cefotaxima, ceftazidima, ciprofloxacina, levofloxacina, piperacilina/tazobactam, gentamicina, tobramicina, nitrofurantoína e trimetoprim/sulfametoxazole) (figura 14).

Comparando os isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* não produtores de ESBL, como se verifica na figura 15, os isolados de *Klebsiella pneumoniae* apresentaram percentagens de resistência bastante superiores às dos isolados de *Escherichia coli* na maioria dos antibióticos testados, com exceção da cefalotina e da cefotaxima.



**Figura 15** – Perfil de resistência dos isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* não produtores de ESBL





## **VI. DISCUSSÃO**

---



As infeções provocadas por microrganismos produtores de ESBL tornaram-se uma constante preocupação para o desenvolvimento de terapias antimicrobianas, pois, estas infeções têm um grande impacto nas taxas de mortalidade e de morbilidade, mas também nos custos a nível hospitalar e comunitário (3, 85). A disseminação de estirpes produtoras de ESBL na comunidade está a tornar-se uma preocupação acrescida. Tal facto acontece porque as implicações clínicas das ESBL são demasiado sérias, pelo que é fundamental o uso de métodos de diagnóstico sensíveis e específicos, com o intuito de conduzir corretamente a terapêutica, monitorizar a resistência antimicrobiana e implementar estratégias de intervenção. Assim, a criação de plataformas rápidas de vigilância epidemiológica local, são da máxima importância. A base de dados criada é versátil e permite a monitorização personalizada do doente. A qualquer episódio de urgência, ou posterior internamento, o registo dos microrganismos isolados, relativos a um dado doente pode ser filtrado. Esta ferramenta permite ao patologista clínico aceder à informação contida na base de dados e informar o clínico, o que permitirá uma poupança de tempo e um tratamento empírico mais dirigido e seguro.

Ao observar a distribuição dos doentes estudados neste trabalho, verificamos que 53% dos pacientes são do género feminino e 47% são do género masculino. Embora esta diferença não seja grande, está de acordo com o esperado, ou seja, uma maior percentagem em pacientes do género feminino. No que diz respeito às idades dos pacientes, só foram incluídos nestes estudo dados de doentes com idade igual ou superior a 65 anos, o que quer dizer que foi analisada a faixa etária com maior incidência de infeções do trato urinário. Os idosos estão mais susceptíveis a estas infeções devido a um sistema imunitário mais fragilizado, reduzida mobilidade, nutrição pobre, dificuldade em realizar corretamente a higiene diária e alguns necessitem de usar fraldas ou pelo facto de estarem algaliados. Neste trabalho observou-se que os pacientes estudados tinham idades compreendidas entre os 65 e os 104 anos, mas a maioria (49,1%) pertence à faixa etária dos 75 aos 84 anos. Todos os fatores referidos anteriormente condicionam a vulnerabilidade dos pacientes desta faixa etária (12).

Vários estudos já realizados por diversos autores apontam para fatores de risco associados à aquisição de microrganismos produtores de ESBL: hospitalizações prévias, infeções do trato urinário recorrentes e idade superior a 60 anos (45, 51, 86). Outros estudos encontrados na literatura evidenciam que as infeções do trato urinário (ITU) são

mais frequentes no género feminino (>60%), sendo que esta distribuição está relacionada com as diferenças anatómicas entre ambos os géneros, pois, no género feminino a uretra é mais curta e a proximidade existente entre a uretra e o ânus favorecem a ascensão de bactérias para o trato urinário (8, 9, 87).

Os agentes etiológicos isolados com maior frequência neste estudo foram bactérias Gram-negativas, que constituem 88% do total de isolamentos. Dos restantes microrganismos isolados, 7,3% foram bactérias Gram-positivas e 4,7% fungos. As amostras de urina analisadas revelaram uma grande diversidade de microrganismos, sendo que das bactérias Gram-negativas a maioria dos isolados foram espécies da família *Enterobacteriaceae* (88,5%). Tal como descrito na literatura, o microrganismo mais encontrado nas infeções do trato urinário estudadas foi a *Escherichia coli* (54,7%), seguida das espécies *Klebsiella pneumoniae* (22,5%), *Pseudomonas aeruginosa* (8,3%) e *Proteus mirabilis* (4,8%).

Quanto à etiologia das infeções do trato urinário, a *Escherichia coli* tem sido apontada como o microrganismo mais frequentemente encontrado neste tipo de infeções, contudo, microrganismos como *Staphylococcus* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., e *Proteus* spp., também estão entre as estirpes mais isoladas (88, 89). Num estudo realizado em 2007, foi estudada a etiologia de infeções do trato urinário adquiridas na comunidade, onde isolaram 100 microrganismos, dos quais 92% foram bactérias Gram-negativas e 8% bactérias Gram-positivas (90). Os microrganismos mais prevalentes foram a *Escherichia coli* (61%), *Klebsiella pneumoniae* (22%), *Staphylococcus aureus* (7%) e *Pseudomonas aeruginosa* (4%) (90). Num outro estudo reportado no mesmo ano, em Portugal (Bragança), estudaram os agentes etiológicos de 428 doentes com infeções do trato urinário, dos quais 68,4% apresentaram como microrganismo a *Escherichia coli*, 7,9% *Klebsiella* spp., 6,1% *Pseudomonas aeruginosa*, e 5,2% *Proteus mirabilis* (87). Num outro estudo sobre a prevalência de bactérias em ITU realizado em 2010, foram analisadas 257 amostras de urina, sendo que os microrganismos mais prevalentes foram *Escherichia coli* (40,3%), *Staphylococcus* coagulase negativa (16,1%) e *Klebsiella pneumoniae* (11,2%) (91).

Vários estudos realizados em várias partes do mundo evidenciam o facto de que ocorrência de microrganismos produtores de ESBL apresenta variações geográficas consideráveis. Em 2006, num estudo espanhol que englobou 15 laboratórios de

microbiologia sobre a prevalência de estirpes produtoras de ESBL, foram encontradas estirpes de *Escherichia coli* produtoras de ESBL responsáveis por 6,5% das ITU comunitárias, enquanto que as espécies *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL apresentaram prevalências de 12,9% (3). Em Portugal, num estudo realizado em 2007, foram recolhidos 181 isolados de *Escherichia coli* de nove hospitais em três regiões diferentes, dos quais 119 isolados foram identificados como produtores de ESBL, nomeadamente,  $\beta$ -lactamases do tipo CTX-M, prevalentes em infeções adquiridas na comunidade (56%), em infeções urinárias (76%) e em pacientes com idade igual ou superior a 60 anos (76%) (88). Num estudo realizado na Ásia, em 2009, 6750 isolados de bactérias Gram-negativas foram investigados para a presença de ESBL, que foi detetada em 6% (409/6750) dos microrganismos e sendo a maioria *Escherichia coli* (83%) (92). A urina foi o produto biológico mais estudado, sendo que 74,4% desses produtos tiveram como fonte pacientes com infeções urinárias adquiridas na comunidade (92). Em 2010, num estudo realizado no Brasil sobre estirpes da família *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL, a produção destas  $\beta$ -lactamases foi observada em 24,8% (208/838) dos isolados avaliados, em que a *Escherichia coli* representou 46,2% dos isolados produtores de ESBL, seguida de espécies de *Enterobacter* (30,3%) (93). Os isolados produtores destas  $\beta$ -lactamases foram obtidos maioritariamente de urina (n=79) (93).

Mais recentemente, num estudo realizado nos Estados Unidos sobre a ocorrência de isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBL, foram examinados 291 pacientes com infeções adquiridas na comunidade (n=107; 36,8%) ou com 48h de hospitalização (n=184; 63,2%) (94). Dos pacientes com infeções adquiridas fora do meio hospitalar, 81,5% representam infeções do trato urinário e em mais de 90% foram isoladas ESBL do tipo CTX-M (94). Num outro estudo, efetuado no continente asiático, sobre microrganismos produtores de ESBL em ITU, foram analisados 200 isolados e a *Escherichia coli* foi o microrganismo mais identificado (57%), seguido da *Klebsiella pneumoniae* (11%) (95). A produção de ESBL foi maior nos isolados de *Klebsiella pneumoniae* (72,7%) do que nos de *Escherichia coli* (53,5%) (95).

Assim, a maioria dos estudos descritos na literatura mostram que a *Escherichia coli* é a estirpe produtora de ESBL mais comum em infeções hospitalares como comunitárias, seguida por *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. e *Citrobacter* spp. (96). O género feminino continua a ser o mais afetado por infeções provocadas por microrganismos produtores de

ESBL, assim como pacientes com idade superior a 60 anos (96).

Neste trabalho foram selecionados todos os isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* que foram testados para a produção de ESBL com o teste VITEK®2 ESBL e confirmados por E-test. A produção de ESBL nos isolados incluídos neste trabalho foi detetada em 28,8% dos microrganismos (17% *Klebsiella pneumoniae* e 11,8% *Escherichia coli*), sendo a prevalência de isolados produtores de ESBL maior nos isolados de *Klebsiella pneumoniae* do que nos de *Escherichia coli*. No entanto, os valores encontrados variam em função do tipo e dimensão da instituição em estudo, de acordo com as políticas de controlo de infeção aplicadas, das características dos doentes estudados e do desenho/plano do estudo (51, 86). Os resultados obtidos neste trabalho para a incidência destas infeções nos indivíduos do género feminino e na população mais idosa estão de acordo com os dados encontrados na literatura.

Os resultados encontrados neste estudo relativamente à população com infeção do trato urinário provocadas por microrganismos produtores de ESBL, são similares aos encontrados noutros estudos, onde mais de 55% das *Escherichia coli* produtoras de ESBL foram encontradas em indivíduos do género feminino e com predomínio nos pacientes com idades compreendidas entre os 75 e 84 anos (52,4%). No que diz respeito aos isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBL, não se verificou diferenças significativamente relevantes entre o género feminino e o género masculino. Contudo, 51% das *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL foram encontradas em pacientes com idades compreendidas entre os 85 e 94 anos. A elevada frequência encontrada neste estudo dos isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBL em mulheres, poderá estar relacionada com uma maior susceptibilidade destas a infeções do trato urinário, devido às condições anatómicas femininas já referidas anteriormente. A alta prevalência de isolados produtores de ESBL em doentes na faixa etária igual ou superior a 65 anos, encontrada neste estudo, está de acordo com outros estudos que identificaram vários fatores de risco na aquisição de infeções comunitárias por microrganismos da família *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL (86, 97). Tudo indica que a idade avançada dos doentes juntamente com hospitalizações recorrentes, a falta de higiene diária e o uso de dispositivos invasivos serão fatores de risco para adquirir infeções do trato urinário por microrganismos produtores de ESBL.

Num estudo realizado no Hospital Infante D. Pedro e publicado em 2011, sobre a deteção de espécies da família *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL entre 2008 e 2010, de um total de 15843 isolados, foram detetados 222 isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBL e 263 isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores destas mesmas  $\beta$ -lactamases (98). O que significa que nesta altura já havia uma maior incidência dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBL neste hospital, pois a ocorrência de espécies de *Klebsiella pneumoniae* produtoras destas  $\beta$ -lactamases aumentou de 20% em 2008 para mais de 50% em 2010 (98). Por outro lado, a ocorrência de espécies de *Escherichia coli* produtoras de ESBL diminuiu em 2010, no entanto a produção destes isolados continuou a ser considerável (98).

Num outro estudo publicado em 2012, com dados referentes ao ano de 2011, também realizado no Hospital Infante D. Pedro, sobre a prevalência de espécies produtoras de ESBL em infeções do trato urinário, incluiu os mesmos critérios de seleção que foram aplicados nesta dissertação (99). Durante um período de 10 meses, de um total de 6406 amostras de urina, 272 isolados foram selecionados para esse estudo. Tal como acontece nos dados desta dissertação, não existiram diferenças significativas entre a prevalência de isolados de pacientes do género feminino e masculino. A espécie mais prevalente nesse estudo foi a *Klebsiella pneumoniae* (35,7%), seguida das espécies *Escherichia coli* (29,8%) e *Pseudomonas aeruginosa* (14,3%). Como se pode observar no ANEXO I, comparativamente aos resultados desta dissertação, durante o mesmo período de tempo mas em 2012, o microrganismo mais prevalente foi *Escherichia coli* (48,4%), seguida de *Klebsiella pneumoniae* (19%) e *Pseudomonas aeruginosa* (7,5%). Desde já se pode verificar um elevado aumento na prevalência da espécie *Escherichia coli* como microrganismo causador de infeções do trato urinário no ano de 2012 no HIP. Em relação às espécies produtoras de ESBL, verificou-se um decréscimo do ano 2011 para 2012 neste hospital. Isto é, em 2011, foram detetados 82,5% de isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBL, e 44,4% de isolados de *Escherichia coli* produtores destas mesmas  $\beta$ -lactamases. Já em 2012, os dados desta dissertação revelaram que 60,4% dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* foram considerados produtores de ESBL e 15,6% dos isolados de *Escherichia coli* também (ANEXO I). Apesar do decréscimo observado em ambas as espécies, os microrganismos produtores destas  $\beta$ -lactamases continuam a ser um motivo de preocupação nesta região, nomeadamente no Centro Hospitalar do Baixo Vouga, EPE.



Actualmente, um dos principais motivos de preocupação a nível hospitalar é a resistência aos antibióticos. Como tal, a vigilância da susceptibilidade dos microrganismos causadores de infeções às várias classes de antibióticos usados na terapêutica é da maior relevância. A avaliação da susceptibilidade/resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos apresenta uma importância particularmente acrescida, pois, estes agentes antimicrobianos são os mais utilizados no tratamento de infeções bacterianas em Portugal (100). No entanto, vários relatos têm surgido ao longo dos últimos anos, indicando uma correlação entre a produção de ESBL e a resistência a outros grupos de antibióticos (101-103).

A grande parte dos protocolos terapêuticos para infeções do trato urinário não complicadas aconselha o tratamento empírico dos doentes com a realização das respetivas uroculturas em simultâneo, tendo como fundamento a estratégia de que, para uma determinada área geográfica e determinada patologia, é imprescindível o conhecimento dos principais agentes etiológicos implicados e o seu padrão de resistência/susceptibilidade em cada zona geográfica (6, 13, 104). De acordo com as *guidelines* internacionais da *European Association of Urology*, a utilização empírica de um antibiótico só deve ser realizada se este não apresentar taxas de resistência local superior a 20% (14).

Assim, no âmbito de averiguar o perfil de susceptibilidade aos antibióticos das amostras deste trabalho, verificou-se que os isolados de bactérias Gram-negativas foram resistentes à maioria dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, nomeadamente à ampicilina, cefalotina, cefotaxima e cefuroxima, às quinolonas, a alguns aminoglicosídeos (gentamicina e tobramicina) e ao trimetoprim/sulfametoxazole. Os resultados obtidos permitiram constatar, no entanto, que a susceptibilidade aos carbapenemos, consequência da ausência de carbapenemases, foi predominante. O que quer dizer que, actualmente, a vigilância da susceptibilidade aos carbapenemos é crucial (102). Estes isolados foram predominantemente susceptíveis à colistina. A susceptibilidade à colistina poderá ser devido à ausência de pressão de seleção. De facto, este antibiótico foi utilizado durante várias décadas, mas foi posteriormente excluído da terapêutica convencional por estar associado a casos de neurotoxicidade e nefrotoxicidade (105).

Analisando o perfil de resistência aos antibióticos das estirpes de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL, verificamos que os isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBL apresentaram percentagens de resistência superiores às dos isolados de *Escherichia coli* produtores destas  $\beta$ -lactamases em dez dos antibióticos

testados (cefotaxima, ceftazidima, cefuroxima, ciprofloxacina, trimetoprim/sulfametoxazole, gentamicina, levofloxacina, nitrofurantoína, piperacilina/tazobactam e tobramicina). Para ambas as linhagens produtoras de ESBL foram obtidas taxas de resistências de 100% à ampicilina, pois, a fraca ação das penicilinas frente aos isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* está associada à prevalência de  $\beta$ -lactamases, pelo que se desaconselha a sua utilização quando este antibiótico não está associado a um inibidor destas enzimas, como por exemplo a associação amoxicilina/ácido clavulânico. Para estas estirpes, este facto foi constatado neste estudo, onde se obteve maior susceptibilidade, ou seja, uma menor resistência com o uso da associação  $\beta$ -lactâmico/inibidor das  $\beta$ -lactamases. Nos isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBL obteve-se 55,9% de resistência à amoxicilina/ácido clavulânico e 8,8% à piperacilina/tazobactam. E de forma similar, os isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBL apresentaram 22,4% de resistência à amoxicilina/ácido clavulânico e 30,6% à piperacilina/tazobactam. Ambas as estirpes produtoras de ESBL apresentaram taxas de resistência próximas de 100% às quinolonas (ciprofloxacina e levofloxacina), e à maioria das cefalosporinas testadas, o que está de acordo com a definição de ESBL.

Em 2010, foi detetado pela primeira vez em Portugal um isolado de *Klebsiella pneumoniae* produtor de ESBL resistente às quinolonas (106). Este isolado expressava no mesmo plasmídeo genes de resistência às quinolonas (*qnrA* e *qnrB*) concomitantemente com os genes *bla*<sub>TEM-1</sub> e/ou *bla*<sub>SHV-1</sub> (106). Esta associação de genes que já tinha sido demonstrada por um estudo realizado em 2006 na Argentina, poderá explicar o fenómeno de resistência associado entre fluoroquinolonas e antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em estirpes da família *Enterobacteriaceae*, e assim, explicar a capacidade de co-seleção entre os dois tipos de resistência e os respectivos fármacos (101). A co-resistência entre diferentes grupos de fármacos está descrita para as estirpes produtoras de ESBL em geral, contudo, poderá ser mais vincada no caso das  $\beta$ -lactamases do tipo CTX-M (107).

Já em 2004, foi relatado um caso de bacteriemias causadas por isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBL, em que os rácios de mortalidade eram inferiores nos pacientes em que era aplicada uma terapia com combinações de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos/inibidor das  $\beta$ -lactamases ou com carbapenemos, quando comparado com o rácio dos pacientes em que apenas se utilizaram cefalosporinas ou fluoroquinolonas (9%vs35%)(51).

Nos isolados deste trabalho que foram considerados ESBL positivos, a resistência cruzada com a amicacina foi menos prevalente em ambas as estirpes, pois, este aminoglicosídeo apresentou uma das melhores sensibilidades (87,1% de susceptibilidade nos isolados de *Escherichia coli* e 100% nos de *Klebsiella pneumoniae*). Porém, o seu uso é bastante restrito em infecções do trato urinário devido ao facto de ser um antibiótico de recurso, ou seja, especificamente usado para situações mais graves, como em pacientes internados no serviço de medicina intensiva (18, 108).

Dos antibióticos testados, a associação trimetoprim/sulfametoxazole é o fármaco usualmente recomendado para o tratamento de cistites e infecções do trato urinário onde a *Escherichia coli* é o microrganismo mais frequentemente envolvido (109). No entanto, o uso deste antimicrobiano tem sido comprometido pelo aumento da resistência antimicrobiana, principalmente entre as espécies produtoras de ESBL (109). Neste estudo, obtiveram-se taxas de resistência bastante consideráveis a este fármaco, sendo que os isolados de *Escherichia coli* ESBL positivos apresentaram 58,8% de resistência ao trimetoprim/sulfametoxazole e os isolados de *Klebsiella pneumoniae* ESBL apresentaram 77,6% de resistência. Assim, o tratamento de pacientes com infecções do trato urinário causadas por estirpes produtoras de ESBL fica limitado a poucos agentes de amplo espectro de ação, os quais poderão também falhar face aos microrganismos que produzem múltiplas  $\beta$ -lactamases que, associadas, produzem múltipla resistência. Os fármacos que a totalidade dos autores recomenda para o tratamento de infecções causadas por bactérias produtoras de ESBL são os carbapenemos, devido ao facto destes antibióticos não sofrerem hidrólise pelas ESBL (102). Contudo, devido à descrição de resistência a estes agentes, é fundamental assinalar que no tratamento de infecções do trato urinário, o uso de outros fármacos como a ciprofloxacina ou amicacina, pode permitir, pelo menos em parte, diminuir o uso de carbapenemos.

Em relação ao perfil de susceptibilidade aos antibióticos testados, os resultados mostram que as linhagens de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL foram sensíveis aos carbapenemos (ertapenem, imipenem e meropenem) indicando que são os antibióticos de escolha para tratar infecções graves causadas por bactérias produtoras de ESBL (110, 111). Os carbapenemos têm sido considerados a primeira escolha para o tratamento destas infecções, no entanto, têm surgido resistências e dado não

se tratarem de antibióticos de ambulatório, a sua administração obriga a internamento hospitalar (102, 112). Estes isolados apresentaram também 100% de susceptibilidade à cefepima (cefalosporina de 4<sup>a</sup> geração), que tem sido proposta como alternativa aos carbapenemos, mas associada a um monobactâmico (112, 113). Esta associação, cefepima/tazobactam, tem mostrado uma elevada atividade contra estirpes produtoras de ESBL, no entanto, são necessários mais estudos no sentido de averiguar se realmente é uma alternativa viável aos carbapenemos (112, 113).

Os nitrofuranos, nomeadamente a nitrofurantoína, são também maioritariamente utilizados no tratamento de infeções urinárias provocadas por multirresistentes (114). Neste estudo foi verificado que, tanto os isolados de *Escherichia coli* como os de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBL, apresentaram resistências superiores à nitrofurantoína comparativamente com os isolados destas espécies não produtoras de  $\beta$ -lactamases. É devido à degradação deste antibiótico provocada por nitroredutases bacterianas que resultam compostos intermediários, altamente reativos, que vão interferir com a síntese proteica e causar morte celular (114, 115). Dada a vastidão destas enzimas na célula bacteriana, julga-se que os baixos níveis de resistência à nitrofurantoína devem-se à combinação dos múltiplos locais alvo e múltiplos mecanismos de acção do antibiótico (114). Assim, a nitrofurantoína parece ser uma alternativa razoável ao uso de antibióticos como o trimetoprim/sulfametoxazole e fluoroquinolonas no tratamento empírico de infeções do trato urinário complicadas, especialmente dada a atual prevalência da resistência aos antibióticos por parte de agentes uropatogénicos adquiridos na comunidade (116).

Neste trabalho, podemos constatar que os isolados de *Klebsiella pneumoniae* não produtores de ESBL apresentaram taxa de resistências bastante superiores às dos isolados de *Escherichia coli* não produtores destas  $\beta$ -lactamases, à maioria dos antibióticos testados, com excepção da cefalotina e cefotaxima. Este facto quer dizer que, neste momento, apesar do microrganismo mais prevalente em infeções do trato urinário ser a *Escherichia coli*, existe uma preocupação acrescida quando estas infeções são causadas por estirpes de *Klebsiella pneumoniae*, pois, as opções de tratamento tornam-se bastante mais restritas devido às elevadas taxas de resistências observadas nestes microrganismos.

A presença de estirpes produtoras de ESBL em infeções do trato urinário torna-se cada vez mais problemática, devido às elevadas resistências existentes nessas espécies.

Com este estudo foi possível demonstrar que as percentagens de resistências existentes nos isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBL foram claramente superiores às percentagens de resistências dos microrganismos não produtores destas  $\beta$ -lactamases.

Globalmente, este trabalho demonstra um cenário preocupante no que se refere à resistência aos antibióticos no hospital de Aveiro. Este estudo permitiu, assim, demonstrar a existência de estirpes produtoras de ESBL em isolados de pacientes provenientes da comunidade, particularmente em pacientes idosos com infeções do trato urinário, que no nosso país são cada vez mais. É fundamental a sensibilização dos laboratórios de microbiologia para a deteção de estirpes produtoras de ESBL e a monitorização terapêutica adequada, para aconselhar o clínico na seleção do antibiótico adequado, de forma a diminuir o consumo de antibióticos inadequados que contribuem para a pressão seletiva com aparecimento de estirpes resistentes (35, 42).

## **VII. CONCLUSÃO**

---



A existência de estirpes produtoras de ESBL em infecções do trato urinário é uma realidade por todo o Mundo, mas ainda é pouco relatada no nosso país. Nesse contexto, é importante contemplar este tipo de estudos em ambientes relevantes na disseminação da resistência aos antibióticos. Assim, é necessário conhecer com exatidão a origem destas espécies: hospital ou comunidade. A presença de genes que codificam para ESBL, juntamente com genes que conferem resistência a vários grupos de antibióticos diminui fortemente as opções terapêuticas. Para tal, a prescrição da terapêutica empírica adequada bem como a profilaxia, devem ser sustentadas por uma análise periódica das susceptibilidades dos principais agentes causadores presentes numa área geográfica ou numa instituição de saúde.

O controlo e prevenção de infecções do trato urinário são, portanto, altamente prioritários perante doentes infetados com *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBL, sendo que estes pacientes devem ser isolados dos restantes doentes de modo a evitar a ocorrência de surtos nos hospitais. Assim, o conhecimento dos determinantes de resistência presentes bem como a sua monitorização e/ou caracterização permitem obter dados importantes epidemiológicos tendo como finalidade estabelecer rigorosos protocolos de decisão terapêutica bem como implementar procedimentos de controlo de infeção de modo a minimizar a disseminação desses mesmos determinantes.

Resumidamente, as principais conclusões que se podem retirar deste trabalho são as seguintes:

- Verificou-se uma maior percentagem de infecções do trato urinário em indivíduos do género feminino e em pacientes com idades compreendidas entre os 75 e 84 anos;
- Mais de 80% dos isolados estudados foram bactérias Gram-negativas;
- Dentro do grupo das bactérias Gram-negativas, 88,5% foram microrganismos da família *Enterobacteriaceae*;
- O principal agente etiológico destas infecções urinárias foi a *Escherichia coli* (54,7%);
- Mais de 28% dos isolados que foram sujeitos à pesquisa de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido foram classificados como produtores de ESBL;



- Dos isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBL, mais de 50% foram encontrados em indivíduos do gênero feminino e com idades entre os 75 e 84 anos;
- A produção de ESBL intra-espécie foi detetada em 58,3% dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* e em 16,7% dos isolados de *Escherichia coli*;
- Os isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBL apresentaram elevadas taxas de resistência a penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, aminoglicosídeos e às associações de antibióticos amoxicilina/ácido clavulênico e trimetropim/sulfametoxazole;
- Os antibióticos contra os quais os isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBL apresentaram menores taxas de resistência foram a amicacina, nitrofurantoína e piperacilina/tazobactam;
- Em relação aos isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBL, os antibióticos que demonstraram menor atividade foram as penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, aminoglicosídeos, nitrofurantoína e ao trimetropim/sulfametoxazole;
- Os antibióticos com melhor atividade frente a todos os isolados produtores de ESBL foram os carbapenemos (imipenem, ertapenem e meropenem).

Assim, os resultados deste estudo enfatizam a extrema importância dos programas de vigilância epidemiológica e de resistência bacteriana a antimicrobianos na orientação terapêutica empírica, mas também, a importância da implementação de medidas de controle de infecção e racionalização do uso de antibióticos.

## **VIII. BIBLIOGRAFIA**

---



1. Llarull, L., Testero, S., Fisher, J., and Mobashery, S. (2010) The future of the  $\beta$ -lactams, *Current Opinion in Microbiology* 13, 551-557.
2. Hoban, D., Lascols, C., Nicolle, L., Badal, R., Bouchillon, S., Hackel, M., and Hawser, S. (2012) Antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae, including molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing species, in urinary tract isolates from hospitalized patients in North America and Europe: results from the SMART study 2009–2010, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 74, 62-67.
3. Coque, T., Baquero, F., and Canton, R. (2008) Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe, *Euro Surveill* 13, 1-11.
4. Lee, J., Lee, N., Lee, H., Huang, W., Tsui, K., Chang, C., Lee, C., Chen, P., Wu, C., Hsueh, P., and Ko, W. (2012) Clinical characteristics of urosepsis caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli or Klebsiella pneumonia and their emergence in the community, *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 45, 127-133.
5. Hoban, D., Bouchillon, S., Hawser, S., and Badal, R. (2010) Trends in the frequency of multiple drug-resistant Enterobacteriaceae and their susceptibility to ertapenem, imipenem, and other antimicrobial agents: data from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends 2002 to 2007, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 66, 78-86.
6. Wagenlehner, F., Cek, M., Naber, K., Kiyota, H., and Bjerklund-Johansen, T. (2012) Epidemiology, treatment and prevention of healthcare-associated urinary tract infections, *World Journal of Urology* 30, 59-67.
7. Wagenlehner, F., Niemetz, A., Weidner, W., and Naber, K. (2008) Spectrum and antibiotic resistance of uropathogens from hospitalised patients with urinary tract infections: 1994–2005, *International Journal of Antimicrobial Agents* 31, 25-34.
8. Almeida, M., Simões, M., and Raddi, M. (2007) Ocorrência de infecção urinária em pacientes de um hospital universitário, *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 28, 215-219.
9. Sheerin, N. (2011) Urinary tract infection, *Medicine* 39, 384-389.
10. Srivastava, R., and Vasudev, A. (2011) Urinary tract infections—current management, *Apollo Medicine* 8, 270-275.
11. Bishop, M. (2004) Uncomplicated Urinary Tract Infection, *European Association of Urology* 2, 143-150.
12. Matthews, S., and Lancaster, J. (2011) Urinary Tract Infections in the Elderly Population, *The American Journal of Geriatric Pharmacotherapy* 9, 286-309.
13. Grabe, M., Bishop, M., Bjerklund-Johansen, T., Botto, H., Çek, M., Lobel, B., Naber, K., Palou, J., Tenke, P., and Wagenlehner, F. (2009) Guidelines on Urological Infections, *Arnhem, The Netherlands: European Association of Urology*.
14. Gupta, K., Hooton, T., Naber, K., Wullt, B., Colgan, R., Miller, L., Moran, G., Nicolle, L., Raz, R., Schaeffer, A., and Soper, D. (2011) International Clinical Practice Guidelines for the Treatment of Acute Uncomplicated Cystitis and Pyelonephritis in Women: A 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases, *Clinical Infectious Diseases* 52, 103-120.
15. King, C., Garcia Alvarez, L., Holmes, A., Moore, L., Galletly, T., and Aylin, P. (2012) Risk factors for healthcare-associated urinary tract infection and their applications in surveillance using hospital administrative data: a systematic review, *Journal of Hospital Infection* 82, 219-226.
16. Franco, A., and Virginia, M. (2005) Recurrent urinary tract infections, *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 19, 861-873.

17. Nickel, J. (2005) Management of urinary tract infections: historical perspective and current strategies: part 2 - modern management, *The Journal of Urology* 173, 27-32.
18. Wagenlehner, F., Wullt, B., and Perletti, G. (2011) Antimicrobials in urogenital infections, *International Journal of Antimicrobial Agents* 38, 3-10.
19. Kenneth, R., and Ray, G. (2004) *Sherris Medical Microbiology - An introduction to infectious diseases* 4th ed.
20. Paradis, S., Boissinot, M., Paquette, N., Bélanger, S., Martel, E., Boudreau, D., Picard, F., Ouellette, M., Roy, P., and Bergeron, M. (2005) Phylogeny of the Enterobacteriaceae based on genes encoding elongation factor Tu and F-ATPase  $\beta$ -subunit, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 2013-2025.
21. Denton, M. (2007) Enterobacteriaceae, *International Journal of Antimicrobial Agents* 29, 9-22.
22. Paterson, D. (2006) Resistance in Gram-Negative Bacteria: Enterobacteriaceae, *The American Journal of Medicine* 119, 20-28.
23. Costa, A., Noriega, E., Fonseca, L., and Silva, M. (2009) Inquérito Nacional de Prevalência de Infecção (25 de Março de 2009). Relatório, Setembro de 2009.
24. Queiroz, M., Antunes, P., Mourão, J., Merquior, V., Machado, E., and Peixe, L. (2012) Characterization of extended-spectrum beta-lactamases, antimicrobial resistance genes, and plasmid content in *Escherichia coli* isolates from different sources in Rio de Janeiro, Brazil, *Diagnostic microbiology and infectious disease* 74, 91-94.
25. Little, M., Qin, X., Zerr, D., and Weissman, S. (2012) Molecular diversity in mechanisms of carbapenem resistance in paediatric Enterobacteriaceae, *International Journal of Antimicrobial Agents* 39, 52-57.
26. Murray, P., Rosenthal, K., and Pealler, M. (2005) *Medical Microbiology. Fifth edition. Elsevier Mosby, USA.*
27. Schaechter, M. (2004) The Desk Encyclopedia of Microbiology, (Elsevier, Ed.), pp 25-43.
28. Grover, N., Sahni, A., and Bhattacharya, S. (2012) Therapeutic challenges of ESBLs and AmpC beta-lactamase producers in a tertiary care center, *Medical Journal Armed Forces India.*
29. Contreras-Martel, C., Dahout-Gonzalez, C., Martins, A., Kotnik, M., and Dessen, A. (2009) PBP Active Site Flexibility as the Key Mechanism for  $\beta$ -Lactam Resistance in *Pneumococci*, *Journal of Molecular Biology* 387, 899-909.
30. Vollmer, W., and Bertsche, U. (2008) Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778, 1714-1734.
31. Tenover, F. (2006) Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria, *The American Journal of Medicine* 119, 3-10.
32. Harbottle, H., Thakur, S., Zhao, S., and White, D. (2006) Genetics of Antimicrobial Resistance, *Animal Biotechnology* 17, 111-124.
33. Lambert, P. (2005) Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites, *Advanced Drug Delivery Reviews* 57, 1471-1485.
34. Li, X., Mehrotra, M., Ghimire, S., and Adewoye, L. (2007)  $\beta$ -Lactam resistance and  $\beta$ -lactamases in bacteria of animal origin, *Veterinary Microbiology* 121, 197-214.
35. Drawz, S., and Bonomo, R. (2010) Three decades of beta-lactamase inhibitors, *Journal of Clinical Microbiology* 23, 160-201.
36. Abraham, E., and Chain, E. (1940) An Enzyme from Bacteria Able To Destroy Penicillin, *Nature* 146, 837.
37. Babic, M., Hujer, A., and Bonomo, R. (2006) What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases, *Drug Resistance Updates* 9, 142-156.
38. Samaha-Kfoury, J., and Araj, G. (2003) Recent developments in  $\beta$  lactamases and extended spectrum  $\beta$  lactamases, *British Medical Journal* 327, 1209-1213.
39. Bush, K. (1989) Characterization of  $\beta$ -lactamases, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 259-263.

40. Hall, B., and Barlow, M. (2005) Revised Ambler classification of  $\beta$ -lactamases, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55, 1050-1051.
41. Bush, K., Jacoby, G., and Medeiros, A. (1995) A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure., *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39:1211-1233.
42. Perez, F., Endimiani, A., Hujer, K., and Bonomo, R. (2007) The continuing challenge of ESBLs, *Current Opinion in Pharmacology* 7, 459-469.
43. Chong, Y., Ito, Y., and Kamimura, T. (2011) Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, *Infection, Genetics and Evolution* 11, 1499-1504.
44. Bradford, P. (2001) Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat, *Clinical Microbiology Reviews* 14, 933-951.
45. Pitout, J., and Laupland, K. (2008) Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern, *The Lancet Infectious Diseases* 8, 159-166.
46. Overdevest, I., Willemsen, I., Elberts, S., Verhulst, C., and Kluytmans, J. (2011) Laboratory Detection of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Evaluation of Two Screening Agar Plates and Two Confirmation Techniques, *Journal of Clinical Microbiology* 49, 519-522.
47. Giske, C., Sundsfjord, A., Kahlmeter, G., Woodford, N., Nordmann, P., Paterson, D., Cantón, R., and Walsh, T. (2009) Redefining extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: balancing science and clinical need, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 63, 1-4.
48. Bush, K., Jacoby, G., Amicosante, G., Bonomo, R., Bradford, P., Cornaglia, G., Garau, J., Giamarellou, H., Jarlier, V., Martinez-Martinez, L., Miriagou, V., Palzkill, T., Pascual, A., Rodríguez-Baño, J., Rossolini, G., Sougakoff, W., and Vatopoulos, A. (2009) Comment on: Redefining extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: balancing science and clinical need, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.
49. Cantón, R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., Baquero, F., and Coque, T. (2008) Prevalence and spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe, *Clinical Microbiology and Infection* 14, 144-153.
50. Spanu, T., Luzzaro, F., Perilli, M., Amicosante, G., Toniolo, A., Fadda, G., and null. (2002) Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae in Italy: implications for resistance to beta-lactams and other antimicrobial drugs, *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46, 196-202.
51. Rodríguez-Baño, J., Navarro, M., Romero, L., Martínez-Martínez, L., Muniain, M., Perea, E., Pérez-Cano, R., and Pascual, A. (2004) Epidemiology and Clinical Features of Infections Caused by Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Nonhospitalized Patients, *Journal of Clinical Microbiology* 42, 1089-1094.
52. Paterson, D., and Bonomo, R. (2005) Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a Clinical Update, *Clinical Microbiology Reviews* 18, 657-686.
53. Jacoby, G., and Munoz-Price, L. (2005) The New  $\beta$ -Lactamases, *New England Journal of Medicine* 352, 380-391.
54. Bonnet, R. (2004) Growing Group of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: the CTX-M Enzymes, *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48, 1-14.
55. Moland, E., Kim, S., Hong, S., and Thomson, K. (2008) Newer  $\beta$ -Lactamases: Clinical and Laboratory Implications, Part I, *Clinical Microbiology Newsletter* 30, 71-77.
56. Humeniuk, C., Arlet, G., Gautier, V., Grimont, P., Labia, R., and Philippon, A. (2002) Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTXM types, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 3045-3049.
57. Kanamori, H., Navarro, R., Yano, H., Sombrero, L., Capeding, M., Lupisan, S., Olveda, R., Arai, K., Kunishima, H., Hirakata, Y., and Kaku, M. (2011) Molecular characteristics of

- extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae from the Philippines, *Acta Tropica* 120, 140-145.
58. Dzierżanowska, D., Kamińska, W., Semczuk, K., Borowiec, D., Matysiak, M., Szumała-Kąkol, A., Gierczyński, R., and Patzer, J. (2010) Carriage of genes for various extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a novel resistance strategy of *Klebsiella pneumoniae* in Poland, *International Journal of Antimicrobial Agents* 35, 392-395.
59. Tsui, K., Wong, S., Lin, L., Tsai, C., Chen, L., and Huang, C. (2012) Laboratory identification, risk factors, and clinical outcomes of patients with bacteremia due to *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Producing Extended-Spectrum and AmpC type  $\beta$ -Lactamases, *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 45, 193-199.
60. Shah, A., Hasan, F., Ahmed, S., and Hameed, A. (2004) Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, *Research in Microbiology* 155, 409-421.
61. Palucha, A., Mikiewicz, B., Hryniewicz, W., and Gniadkowski, M. (1999) Concurrent outbreaks of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing organisms of the family Enterobacteriaceae in a Warsaw hospital, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 44, 489-499.
62. Kitzis, M., Billot-Klein, D., Goldstein, F., Williamson, R., Tran Van Nhieu, G., Carlet, J., Acar, J., and Gutmann, L. (1988) Dissemination of the novel plasmid-mediated beta-lactamase CTX-1, which confers resistance to broad-spectrum cephalosporins, and its inhibition by beta-lactamase inhibitors, *Antimicrobial agents and chemotherapy* 32, 9-14.
63. Naas, T., Mikami, Y., Imai, T., Poirel, L., and Nordmann, P. (2001) Characterization of In53, a Class 1 Plasmid- and Composite Transposon-Located Integron of *Escherichia coli* Which Carries an Unusual Array of Gene Cassettes, *Journal of Bacteriology* 183, 235-249.
64. Junior, M., Ferreira, E., and Conceição, G. (2004) Beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL): um importante mecanismo de resistência bacteriana e sua detecção no laboratório clínico, *NewsLab* 63, 152-174.
65. Wiegand, I., Geiss, H., Mack, D., Stürenburg, E., and Seifert, H. (2007) Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamases among Enterobacteriaceae by Use of Semiautomated Microbiology Systems and Manual Detection Procedures, *Journal of Clinical Microbiology* 45, 1167-1174.
66. Tenover, F., Reller, L., and Weinstein, M. (2007) Rapid Detection and Identification of Bacterial Pathogens Using Novel Molecular Technologies: Infection Control and Beyond, *Clinical Infectious Diseases* 44, 418-423.
67. Grover, S., Sharma, M., Chattopadhyay, D., Kapoor, H., Pasha, S., and Singh, G. (2006) Phenotypic and genotypic detection of ESBL mediated cephalosporin resistance in *Klebsiella pneumoniae*: Emergence of high resistance against cefepime, the fourth generation cephalosporin, *Journal of Infection* 53, 279-288.
68. To, K., Lo, W., Chan, J., Tse, H., Cheng, V., and Ho, P. (2012) Clinical outcome of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* bacteremia in an area with high endemicity, *International Journal of Infectious Diseases* 17, 120-124.
69. Machado, E., Coque, T., Cantón, R., Novais, Â., Sousa, J., Baquero, F., and Peixe, L. (2007) High diversity of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae from Portugal, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60, 1370-1374.
70. Ben-Ami, R., Schwaber, M. J., Navon-Venezia, S., Schwartz, D., Giladi, M., Chmelnitsky, I., Leavitt, A., and Carmeli, Y. (2006) Influx of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase—Producing Enterobacteriaceae into the Hospital, *Clinical Infectious Diseases* 42, 925-934.
71. Hsueh, P., Badal, R., Hawser, S., Hoban, D., Bouchillon, S., Ni, Y., and Paterson, D. (2010) Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of aerobic and facultative Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections in the Asia-Pacific region: 2008 results from SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends), *International Journal of Antimicrobial Agents* 36, 408-414.

72. Enoch, D., Brown, F., Sismey, A., Mlangeni, D., Curran, M., Karas, J., Cone, D., Aliyu, S., Dhanji, H., Doumith, M., Maharjan, S., Meunier, D., and Woodford, N. (2012) Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in a UK district hospital; an observational study, *Journal of Hospital Infection* 81, 270-277.
73. Turner, P. (2005) Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases, *Clinical Infectious Diseases* 41, 273-275.
74. Oteo, J., Navarro, C., Cercenado, E., Delgado-Iribarren, A., Wilhelmi, I., Orden, B., García, C., Miguelañez, S., Pérez-Vázquez, M., García-Cobos, S., Aracil, B., Bautista, V., and Campos, J. (2006) Spread of Escherichia coli Strains with High-Level Cefotaxime and Ceftazidime Resistance between the Community, Long-Term Care Facilities, and Hospital Institutions, *Journal of Clinical Microbiology* 44, 2359-2366.
75. Pfaller, M., and Segreti, J. (2006) Overview of the Epidemiological Profile and Laboratory Detection of Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases, *Infectious Diseases Society of America* 42, 153-163.
76. Pitout, J., Nordmann, P., Laupland, K., and Poirel, L. (2005) Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in the community, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56, 52-59.
77. Stürenburg, E., and Mack, D. (2003) Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control, *Journal of Infection* 47, 273-295.
78. Hsieh, C., Shen, Y., and Hwang, K. (2010) Clinical Implications, Risk Factors and Mortality Following Community-onset Bacteremia Caused by Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) and non-ESBL Producing Escherichia coli, *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 43, 240-248.
79. Muratani, T., and Matsumoto, T. (2006) Urinary tract infection caused by fluoroquinolone- and cephem-resistant Enterobacteriaceae, *International Journal of Antimicrobial Agents* 28, 10-13.
80. Fang, H., Ataker, F., Hedin, G., and Dornbusch, K. (2008) Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum- $\beta$ -lactamases among Escherichia coli Isolates Collected in a Swedish Hospital and Its Associated Health Care Facilities from 2001 to 2006, *Journal of Clinical Microbiology* 46, 707-712.
81. Skippen, I., Shemko, M., Turton, J., Kaufmann, M. E., Palmer, C., and Shetty, N. (2006) Epidemiology of infections caused by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella spp.: a nested case-control study from a tertiary hospital in London, *Journal of Hospital Infection* 64, 115-123.
82. Conceição, T., Brízio, A., Duarte, A., Lito, L., Cristino, J., and Salgado, M. (2005) First Description of CTX-M-15-Producing Klebsiella pneumoniae in Portugal, *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49, 477-478.
83. Silva, K., and Lincopan, N. (2012) Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in Brazil: clinical impact and implications for agribusiness, *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 48, 91-99.
84. BioMérieux Portugal, Lda. Disponível em: <http://www.biomerieux.pt/>.
85. Chong, Y. (2011) Extended-spectrum B-lactamase-producing bacteria: an emerging clinical concern, *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances* 331-337.
86. Garcia-Tello, A., Soria, T., Rodriguez, N., Torres, G., Mateo, E., Cacho, J., Gonzalez, J., Nuñez, C., and Angulo, J. (2009) Epidemiological features of urinary tract infections caused by Enterobacteriaceae extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *European Urology Supplements* 8, 230.
87. Correia, C., Costa, E., Peres, A., Alves, M., Pombo, G., and Estevinho, L. (2007) Etiologia das Infecções do Tracto Urinário e sua susceptibilidade aos Antibióticos., *Acta Médica Portuguesa* 20, 543-549.



88. Mendonça, N., Leitão, J., Manageiro, V., Ferreira, E., and Caniça, M. (2007) Spread of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase CTX-M-Producing *Escherichia coli* Clinical isolates in Community and Nosocomial Environments in Portugal, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51, 1946-1955.
89. Falagas, M., and Karageorgopoulos, D. (2009) Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing organisms, *Journal of Hospital Infection* 73, 345-354.
90. Akram, M., Shahid, M., and Khan, A. (2007) Etiology and antibiotic resistance patterns of community-acquired urinary tract infections in J N M C Hospital Aligarh, India, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 6, 4.
91. Mbanga, J., Dube, S., and Munyanduki, H. (2010) Prevalence and drug resistance in bacteria of the urinary tract infections in Bulawayo province, Zimbabwe, *East African Journal of Public Health* 7, 229-232.
92. Khanfar, H., Bindayna, K., Senok, A., and Botta, G. (2009) Extended spectrum beta-lactamases (ESBL) in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: trends in the hospital and community settings, *Journal of Infection in Developing Countries* 3, 295-299.
93. Lago, A., Fuentefria, S., and Fuentefria, D. (2010) Enterobactérias produtoras de ESBL em Passo Fundo, estado do Rio Grande do Sul, Brasil, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 43, 430-434.
94. Doi, Y., Park, Y., Rivera, J., Adams-Haduch, J., Hingwe, A., Sordillo, E., Lewis, J., Howard, W., Johnson, L., Polsky, B., Jorgensen, J., Richter, S., Shutt, K., and Paterson, D. (2013) Community-Associated Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Infection in the United States, *Clinical Infectious Diseases* 56, 641-648.
95. Khan, S., Feroz, F., and Noor, R. (2013) Study of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing bacteria from urinary tract infections in Bangladesh, *Tzu Chi Medical Journal* 25, 39-42.
96. Riaz, S., Faisal, M., and Hasnain, S. (2012) Prevalence and comparison of Beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp from clinical and environmental sources in Lahore, Pakistan, *African Journal of Microbiology Research* 6, 465-470.
97. Khanfar, H., Bindayna, K., Senok, A., and Botta, G. (2009) Extended spectrum beta-lactamases (ESBL) in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: trends in the hospital and community settings, *The Journal of Infection in Developing Countries* 3, 295-299.
98. Ferreira, S., Paradela, A., Diaz, R., Rocha, S., and Ramalheira, E. (2011) Detection of ESBL-producing Enterobacteriaceae during 2008-2010, in Aveiro, Portugal. <http://www.eccmidabstracts.com/abstract.asp?id=93612>, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.
99. Ferreira, S., Diaz, R., Rocha, S., Paradela, A., and Ramalheira, E. (2012) Prevalence of ESBL-producers causing urinary tract infections, in Aveiro, Portugal. [http://registration.akm.ch/einsicht.php?XNABSTRACT\\_ID=142981&XNSPRACHE\\_ID=2&XNKONGRESS\\_ID=161&XNMASKEN\\_ID=900](http://registration.akm.ch/einsicht.php?XNABSTRACT_ID=142981&XNSPRACHE_ID=2&XNKONGRESS_ID=161&XNMASKEN_ID=900), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.
100. Goossens, H., Ferech, M., Vander Stichele, R., and Elseviers, M. (2005) Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study, *The Lancet* 365, 579-587.
101. Bermejo, J., Bencomo, B., Arnesi, N., Lesnaberes, P., Borda, N., and Notario, R. (2006) Alta correlación entre el consumo de ciprofloxacina y la prevalencia de *Klebsiella pneumoniae* productora de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, *Revista chilena de infectología* 23, 316-320.
102. Fournier, D., Chirouze, C., Leroy, J., Cholley, P., Talon, D., Plésiat, P., and Bertrand, X. (2013) Alternatives to carbapenems in ESBL-producing *Escherichia coli* infections, *Médecine et Maladies Infectieuses* 43, 62-66.
103. Al-Assil, B., Mahfoud, M., and Hamzeh, A. (2013) Resistance trends and risk factors of extended spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* infections in Aleppo, Syria, *American Journal of Infection Control*, 12.

104. Gupta, K., Hooton, T., and Stamm, W. (2001) Increasing Antimicrobial Resistance and the Management of Uncomplicated Community-Acquired Urinary Tract Infections, *Annals of Internal Medicine* 135, 41-50.
105. Michalopoulos, A., and Karatza, D. (2010) Multidrug-resistant Gram-negative infections: the use of colistin, *Expert Review of Anti-infective Therapy* 8, 1009-1017.
106. Ferreira, S., Toleman, M., Ramalheira, E., Da Silva, G., Walsh, T., and Mendo, S. (2010) First description of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates carrying both *qnrA* and *qnrB* genes in Portugal, *International Journal of Antimicrobial Agents* 35, 584-586.
107. D'Andrea, M., Arena, F., Pallecchi, L., and Rossolini, G. (2013) CTX-M-type  $\beta$ -lactamases: A successful story of antibiotic resistance, *In Press, International Journal of Medical Microbiology*.
108. Xie, J., Talaska, A., and Schacht, J. (2011) New developments in aminoglycoside therapy and ototoxicity, *Hearing Research* 281, 28-37.
109. Guneyssel, O., Onur, O., Erdede, M., and Denizbasi, A. (2009) Trimethoprim/Sulfamethoxazole Resistance in Urinary Tract Infections, *The Journal of Emergency Medicine* 36, 338-341.
110. Martin, E., Tansek, R., Collins, V., Hayakawa, K., Abreu-Lanfranco, O., Chopra, T., Lephart, P., Pogue, J., Kaye, K., and Marchaim, D. (2013) The carbapenem-resistant Enterobacteriaceae score: A bedside score to rule out infection with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae among hospitalized patients, *American Journal of Infection Control* 41, 180-182.
111. Lee, N., Lee, C., Huang, W., Tsui, K., Hsueh, P., and Ko, W. (2012) Carbapenem Therapy for Bacteremia due to Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumoniae*: Implications of Ertapenem Susceptibility, *Antimicrobial agents and chemotherapy*.
112. Sharma, S., Gupta, A., and Arora, A. (2012) Cefepime Tazobactam: A new  $\beta$  lactam/  $\beta$  lactamase inhibitor combination against ESBL producing gram negative bacilli, *International Journal of Pharmaceutical and Biomedical Research* 3, 35-38.
113. Ghafur, A., Tayade, A., and Kannaian, P. (2012) Clinical profile of patients treated with cefepime/tazobactam: A new  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitor combination, *Journal of Microbiology and Infections Diseases* 2, 79-86.
114. Tasbakan, M., Pullukcu, H., Sipahi, O., Yamazhan, T., and Ulusoy, S. (2012) Nitrofurantoin in the treatment of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli*-related lower urinary tract infection, *International Journal of Antimicrobial Agents* 40, 554-556.
115. McKinnell, J., Stollenwerk, N., Jung, C., and Miller, L. (2011) Nitrofurantoin Compares Favorably to Recommended Agents as Empirical Treatment of Uncomplicated Urinary Tract Infections in a Decision and Cost Analysis, *Mayo Clinic Proceedings* 86, 480-488.
116. Cunha, B., Schoch, P., and Hage, J. (2011) Nitrofurantoin: Preferred Empiric Therapy for Community-Acquired Lower Urinary Tract Infections, *Mayo Clinic Proceedings* 86, 1243-1244.



## **IX. ANEXOS**

---



## ANEXO I



## Epidemiology of MDR-Gram-negatives

## Surveillance of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producers causing urinary tract infections in Aveiro, Portugal

S. Soares\*, C. Brandão, S. Ferreira, E. Ramalheira (Aveiro, PT)

**Background:** Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) confer bacterial resistance to all penicillins, cephalosporins, and aztreonam. The aims of the present study were to detect the most prevalent organisms causing urinary tract infection (UTI) in patients entered at the emergency room (ER) and among those to screen for ESBL-producers.

**Materials and Methods:** During 2011 and 2012, isolates were included in this study according the following criteria: belonging to a patient > 65 years old, with a primary diagnostic - UTI and collected in the ER. The identification and susceptibility profile of the isolates were performed with the Vitek2 system (according to CLSI guidelines) and Advanced Expert System (VITEK 2 AES) (BioMérieux, Marcy L'Étoile, France). In both years, *K. pneumoniae* and *E. coli* were further investigated for the presence of ESBL. ESBL producers were confirmed by Etest strips (AB Biodisk) with Cefotaxime/Cefotaxime + Clavulanic acid and Ceftazidime/Ceftazidime + Clavulanic acid, according to manufacturer's instructions.

**Results:** 656 isolates were collected during the last two years. In both years the isolates were selected to this study according to the inclusion criteria. Results are shown in table 1. There was no significant difference in the number of isolates collected from male and female patients. As expected, the most prevalent species were *E. coli* (n=267) and *K. pneumoniae* (n=170), composing about 67% of the UTI pathogens. The ESBL rate was very high at 24% for *E. coli* and 73% for *K. pneumoniae*.

**Conclusions:** The presence of ESBL in clinical specimens is a motif of great concern in our region. The emergence of ESBLs highlights the importance of concepts for the rational use of antibiotics as well as for infection control measures, since the clinical implications of ESBLs carriage can compromise patient's empiric treatment. Until definitive identification and susceptibility testing results are known, options for effective empirical therapy of UTI in Portugal have diminished to include very few (e.g. carbapenems, amikacin) of the agents evaluated in this study.

Table 1. Prevalent species isolated and percentage of ESBL producers among *E. coli* and *K. pneumoniae*.

	Total of urine samples	Clinical isolates selected	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	% of ESBL	
						<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>
2011	6406	272	35,7%	29,8%	14,3%	82,5 %	44,4 %
2012	6300	384	19,0%	48,4%	7,5%	60,4%	15,6 %

## ANEXO II

**Tabela A** - Composição das cartas de identificação para microrganismos Gram-negativos (GNI)

Substratos	
Ala-Fe-Pro-Arilamidase	Sacarose/Sucrose
Adonitol	D-Tagatose
L-Pirrolidonil-Arilamidase	D-Trealose
L-Arabitól	Citrato (Sódio)
D-Celobiose	Malonato
Beta-Galactosidase (ONPG)	5-Queto-D-Gluconato
Produção de H <sub>2</sub> S	Alcalinização L-Lactato
Beta-N-Acetil-Glucosaminidase	Alfa-Glucosidase
Glutamil Arilamidase pNA	Alcalinização Succinato
D-Glucose	Beta-N-Acetil-Galactosaminidase
Gama-Glutamil-Transferase	Alfa-Galactosidase
Fermentação/Glucose	Fosfatase
Beta-Glucosidase	Assimilação Glicina Arilamidase
D-Maltose	Ornitina Descarboxilase
D-Manitol	Lisina Descarboxilase
D-Manose	Base Descarboxilase
Beta-Xilosidase	Assimilação L-Histidina
Beta-Alanina arilamidase pNA	Cumarato
L-Prolina Arilamidase	Beta-Glucoronidase
Lipase	Resistência O/129
Palatinose	Glu-Gli-Arg-Arilamidase
Tirosina Arilamidase	Assimilação L-Malato
Urease	ALLMAN
D-Sorbitol	Assimilação L-Lactato

## ANEXO III

**Tabela B** - Composição da carta de sensibilidade antimicrobiana para microrganismos Gram-negativos (carta AST-N192)

Antimicrobiano	Concentração (µg/ml)	Intervalo de CMI	
		≤	≥
Amicacina	8, 16, 64	2	64
Amoxicilina/Ácido clavulânico	4/2, 16/8, 32/16	2/1	32/16
Ampicilina	4, 8, 32	2	32
Cefalotina	2, 8, 32	2	64
Cefotaxima	1, 4, 16, 32	1	64
Ceftazidima	1, 2, 8, 32	1	64
Cefuroxima	2, 8, 32	1	64
Ciprofloxacina	0.5, 2, 4	0.25	4
Ertapenem	0.5, 1, 6	0.5	8
ESBL	FEP 1, CTX 0.5, CAZ 0.5, FEP/CA 1/10, CTX/CA 0.5/4, CAZ/CA 0.5/4	NEG	POS
Gentamicina	4, 16, 32	1	16
Levofloxacina	0.25, 0.5, 2, 8	0.12	8
Meropenem	0.5, 2, 6, 12	0.25	16
Nitrofurantoína	16, 32, 64	16	512
Piperacilina/Tazobactam	2/4, 8/4, 24/4, 32/4, 32/8, 48/8	4/4	128/4
Tobramicina	8, 16, 64	1	16
Trimetoprim/Sulfametoxazole	1/19, 4/76, 16/304	20(1/19)	320(16/304)

• **NOTA:** Concentrações equivalentes em eficácia ao método padrão. Para ESBL: FEP é cefepima, CTX é cefotaxima, CAZ é ceftazidima e CA é ácido clavulânico. Para estirpes ESBL positivas, o resultado do teste deve ser interpretado como de resistência a todas as penicilinas, cefalosporinas e ao aztreonam; NEG = Negativo (um resultado de teste ESBL negativo não exclui a presença de uma ESBL mascarada por uma β-lactamase AmpC; POS = Positivo; Fonte: BioMérieux (bula AST-N192 REF 412 602)



## ANEXO IV

**Tabela C** - Composição da carta de sensibilidade antimicrobiana para microrganismos Gram-negativos (carta AST-N222)

Antimicrobiano	Concentração (µg/ml)	Intervalo de CMI	
		≤	≥
Amicacina	8, 16, 64	2	64
Aztreonam	2, 8, 32	1	64
Cefepima	2, 8, 16, 32	1	64
Ceftazidima	1, 2, 8, 32	1	64
Ciprofloxacina	0.5, 2, 4	0.25	4
Colistina	4, 16, 32	0.5	16
Gentamicina	4, 16, 32	1	16
Imipenem	1, 2, 6, 12	0.25	16
Meropenem	0.5, 2, 6, 12	0.25	16
Minociclina	2, 4, 8	1	16
Pefloxacina	0.5, 2, 8	0.25	16
Piperacilina	4, 16, 32, 64	4	128
Piperacilina/Tazobactam	2/4, 8/4, 24/4, 32/4, 32/8, 48/8	4/4	128/4
Rifampicina	2, 4, 16	2	32
Ticarcilina	16, 32, 64	8	128
Ticarcilina/Ácido Clavulânico	8/2, 32/2, 64/2	8/2	128/2
Tobramicina	8, 16, 64	1	16
Trimetoprim/Sulfametoxazole	1/19, 4/76, 16/304	20(1/19)	320(16/304)

• NOTA: Concentrações equivalentes em eficácia ao método padrão.

## ANEXO V

Técnica de coloração diferencial pelo Método de Gram (Becton, Dickinson and Company, USA):

1. Colocar sobre a lâmina uma gota de suspensão microbiana e realizar um esfregão;
2. Secar e fixar através de calor;
3. Cobrir o esfregão com solução de violeta de cristal e deixar atuar durante 1 minuto;
4. Retirar o corante e lavar suavemente com água corrente;
5. Cobrir o esfregão com soluto de lugol e deixar atuar durante 1 minuto;
6. Lavar suavemente com água corrente;
7. Descorar com álcool-acetona até que não saia mais cor violeta do esfregão;
8. Lavar suavemente com água corrente;
9. Cobrir a superfície com solução de safranina durante 1 minuto;
10. Lavar com água corrente e deixar secar ao ar;
11. Observar ao microscópio:
  - a) As bactérias coradas de violeta são designadas de Gram-positivas.
  - b) As bactérias coradas de vermelho são designadas de Gram-negativas.

## ANEXO VI

Número Amostra	Nº Exame (doc. vigi@)	Data do pedido	Nº Processo	Nome	SEXO	IDADE	Serviço Requiritante	TIPO AMOSTRA	Microrganismo	ESBL	BMR
163531	232772	01-12-2012			M	05-03-1948	URG MED	URINA	<i>Staphylococcus aureus</i>		SIM
163614	232799	01-12-2012			M	15-01-1937	URG MED	URINA	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NEGATIVA	SIM
163884	232980	03-12-2012			M	20-08-1926	URG	URINA	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NEGATIVA	NÃO
163968	233029	03-12-2012			F	21-01-1946	URG MED	URINA	<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVA	NÃO
567652	232943	03-12-2012			F	16-12-1924	MED 3	URINA	<i>Candida parapsilosis</i>		NÃO
163983	233035	03-12-2012			M	12-10-1924	URG MED	URINA	<i>Enterococcus faecalis</i>		SIM
568029	233024	03-12-2012			F	29-08-1939	MED 2	URINA (ALG)	<i>Candida albicans</i>		NÃO
163896	232992	03-12-2012			M	20-02-1934	URG MED	URINA	<i>Escherichia coli</i>	POSITIVA	SIM
370428	233139	04-12-2012			F	08-03-1957	MED	URINA	<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVA	NÃO
357113	233088	04-12-2012			F	21-09-1937	NEFROLOGIA	URINA	<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVA	NÃO
164211	233208	04-12-2012			M	01-09-1930	URG	URINA	<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVA	NÃO
568109	233154	04-12-2012			F	09-07-1948	MED 1	URINA	<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVA	NÃO
567947	233135	04-12-2012			F	10-06-1922	MED 1	URINA	<i>Candida parapsilosis</i>		NÃO
164336	233315	05-12-2012			F	04-10-1919	URG MED	URINA	<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVA	NÃO
363424	233281	05-12-2012			F	03-04-1924	MED HEPATOLOGIA	URINA	<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVA	NÃO
568075	233270	05-12-2012			F	07-12-1926	MED 1	URINA	<i>Citrobacter freundii</i>		SIM
164251	233224	05-12-2012			M	28-04-1919	URG MED	URINA (ALG)	<i>Staphylococcus aureus</i>		SIM
164248	233221	05-12-2012			F	05-12-1933	URG	URINA	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	POSITIVA	NÃO
568270	233349	05-12-2012			F	30-09-1923	MED 3	URINA	<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVA	NÃO
568204	233439	06-12-2012			F	21-02-1922	MED 1	URINA	<i>Enterococcus faecium</i>		SIM
164877	233639	07-12-2012			M	06-06-1923	URG	URINA	<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVA	NÃO
568424	233513	07-12-2012			F	13-10-1947	PSIQUIATRIA	URINA	<i>Candida glabrata</i>		NÃO
371138	233578	07-12-2012			F	23-12-1983	OBSTETRICIA	URINA	<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVA	NÃO
164873	233635	07-12-2012			M	11-03-1953	URG MED	URINA	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	POSITIVA	SIM
164960	233672	08-12-2012			M	24-04-1924	URG MED	URINA	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	POSITIVA	SIM
568668	233739	09-12-2012			F	16-11-1931	UNIDADE AVC	URINA	<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVA	NÃO
165200	233740	09-12-2012			M	20-12-1926	URG	URINA	<i>Enterococcus faecalis</i>		SIM
165086	233701	09-12-2012			F	05-07-1934	URG MED	URINA	<i>Escherichia coli</i>	POSITIVA	SIM

**Figura A** - Exemplo dos dados demográficos, disponíveis na base de dados criada, relativos a infeções do trato urinário de pacientes do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, EPE – Hospital Infante D. Pedro.